



Sílvia Gisela Almeida Silva

Licenciada em Engenharia Química e Bioquímica

Desenho de experiências aplicado à produção de nanopartículas de PLGA para libertação controlada de Doxorubicina

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora: Doutora Margarida Cardoso, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Doutora Maria Ascensão Carvalho Fernandes Miranda Reis

Arguente: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves

Orientadora: Doutora Maria Margarida Canas Mendes de Almeida Cardoso



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Maio de 2012

Direitos de cópia

Desenho de experiências aplicado à produção de nanopartículas de PLGA para libertação controlada.

Copyright © 2011- Sílvia Gisela Almeida Silva - FCT/UNL - UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Todos os excertos e imagens retirados de diversos artigos, presentes ao longo desta dissertação são reproduzidos sob a permissão dos editores originais e sujeitos às restrições de cópia impostos pelos mesmos. À restante dissertação aplica-se a indicação de direitos de autor em nome de Sílvia Gisela Almeida Silva, FCT/UNL e UNL.

Agradecimentos

Após um grande período de trabalho, que exigiu um grande esforço e bastante persistência, consigo completar esta etapa que me conduz ao final do curso de Engenharia Química e Bioquímica.

Durante este período tive o privilégio de poder contar com a colaboração de um conjunto de pessoas, às quais gostaria de expressar toda a minha gratidão.

À minha orientadora, Professora Doutora Margarida Cardoso, que agradeço, não só por esta oportunidade de trabalhar em algo que sempre me fascinou, mas também por todo o tempo que me dispensou. Muitos foram os conhecimentos que me foram transmitidos e que permitiram o meu desenvolvimento.

À Dona Palminha, por toda a sua simpatia, disponibilidade e ajuda em termos técnicos.

À Inês Peça, não só por toda a paciência, a ajuda a nível laboratorial e por todos os conhecimentos que me transmitiu, mas também por toda a sua amizade e por todo o apoio que me deu quando as dificuldades surgiam.

À minha família e à família Silva, por todo o esforço que fizeram para que eu conseguisse terminar esta etapa, por terem sido o meu apoio e por sempre terem acreditado em mim.

Ao Ângelo Batista, que estive sempre comigo nos bons e maus momentos, constantemente a meu lado, a apoiar-me e a dar-me força para continuar.

Tenho noção que, sem a ajuda preciosa destas pessoas, isto nunca teria sido possível e, por isso deixo a todos, um grande muito obrigada!

Resumo

O objectivo do presente trabalho é produzir nanopartículas de PLGA com Doxorubicina pelo método de extracção/evaporação por solvente e estudar o efeito dos parâmetros de síntese sobre as características das nanopartículas utilizando o desenho de experiências do composto central e o programa Statistica para a análise de resultados.

Foram escolhidas como variáveis dependentes o tamanho da partícula, o potencial zeta (Z), o carregamento de fármaco e o rendimento de produção e como variáveis independentes a concentração de emulsificante (PVA), o volume de emulsificante e o tempo de sonicação.

As nanopartículas produzidas nas condições experimentais dadas pelo desenho de experiências, caracterizadas relativamente ao tamanho por DLS, morfologia por SEM, carregamento de fármaco e rendimento, apresentam uma forma esférica e uma superfície lisa. Foram construídas as curvas de superfície para cada variável dependente utilizando o programa Statistica tendo os resultados mostrado que as variáveis independentes com maior efeito nas variáveis dependentes são o volume e a concentração de PVA.

Com o objectivo de produzir partículas com valores elevados de Z e de carregamento de fármaco com tamanhos entre 120-140nm (A) ou 100-120nm (B), foram seleccionados com base nos gráficos de superfície os valores das variáveis independentes 15 ml; 3%(P/V);60s e 4 ml;3%(P/V);60s, respectivamente.

Nestas condições, as nanopartículas A produzidas apresentaram um tamanho de 125 nm, um $Z=-11.3\text{mV}$, um carregamento de fármaco entre 10.23%-12.58% (mg/mg) e um rendimento entre 53.8%-59.0%, sendo o Z e o rendimento ligeiramente superiores aos valores esperados. As nanopartículas B apresentaram um tamanho de 100 nm, um $Z=-9.5\text{mV}$, um carregamento de fármaco entre 19.44%-21.52% (mg/mg) e um rendimento próximo de 26.2%, sendo o rendimento ligeiramente inferior ao valor esperado.

Os perfis de libertação de Doxorubicina apresentam uma cinética de 1ª ordem, característica de um processo de difusão, seguida de uma cinética de ordem zero, característica de um processo de degradação.

Palavras-chave: Método do composto central, desenho de experiências (DOE), PLGA, Doxorubicina.

Abstract

The aim of this work is to produce PLGA nanoparticles with doxorubicin by the solvent extraction/evaporation method and study the effect of experimental parameters on the characteristics of nanoparticles using the central composite experimental design and the Statistica program to analyze the results.

The dependent variables chosen were the particle size, the zeta potential (Z), the drug load and the production yield and the independent variables chosen were the concentration of emulsifier (PVA), the volume of emulsifier and the time of sonication.

The nanoparticles produced under the experimental conditions given by the experimental design, characterized in size by DLS, in morphology by SEM, in yield and drug load, present a spherical shape with a smooth surface. The surface curves were constructed for each dependent variable by the Statistica program and the results show that the independent variables with the greatest effect in the dependent variables are the volume and the concentration of PVA.

In order to produce particles with the largest value of the zeta potential and drug load ranging in size from 120-140 nm (A) or from 100-120nm (B), the independent variable values were selected based on the surface curves as 15 ml;3%(w/v);60 s and 4 ml;3%(w/v);60s, respectively.

In these conditions, the nanoparticles A produced had a size of 125 nm, Z= -11.3mV, a drug load between 10.23-12.58% (mg/mg) and a yield between 53.8%-59.0%, with the Z and the yield being slightly higher than the expected values. The nanoparticles B produced presented a size of 100 nm, Z=-9.5 mV, a drug load between 19.44-21.52 % (mg/mg) and a yield of 26.2%, slightly lower than the expected value.

The release profiles of Doxorubicin present a first order kinetics, characteristic of a process of transport of drug by diffusion, followed by a zero order kinetic characteristic of a degradation process.

Keywords: Central composite method, Experimental design (DOE), PLGA, Doxorubicin

Índices

Direitos de cópia	I
Agradecimentos.....	III
Resumo.....	V
Abstract	VII
Índices	IX
Índice de materias	XI
Índice de tabelas.....	XIII
Índice de figuras.....	XV
Lista de símbolos e abreviaturas.....	XVII

Índice de matérias

1	Introdução	2
2	Revisão da Literatura	3
2.1	Material polimérico	4
2.2	Fármaco anti tumoral modelo: Doxorubicina	5
2.3	Cinética de Liberação.....	6
2.4	Método de produção de nanopartículas.....	7
2.5	Desenho de Experiências	7
2.5.1	Metodologia de superfície de resposta	9
2.5.2	Desenho de experiências usando o método do composto central.....	10
3	Materiais e Métodos	15
3.1	Materiais.....	15
3.2	Métodos.....	15
3.2.1	Preparação de nanopartículas	15
3.2.1.1	Desenho de experiências para a preparação de nanopartículas de PLGA com Doxorubicina.....	15
3.2.1.2	Preparação de nanopartículas com Doxorubicina	17
3.2.2	Caracterização das nanopartículas.....	17
3.2.2.1	Caracterização Morfológica das Nanopartículas por Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM).....	17
3.2.2.2	Caracterização do tamanho e carga superficial por Dispersão Dinâmica de luz (DLS).....	17
3.2.2.3	Caracterização de Propriedades Cristalinas por Calorimetria de Varrimento Diferencial (DSC)	18
3.2.2.4	Carregamento de doxorubicina	18
3.2.2.5	Rendimento das partículas	18
3.2.3	Ensaio de Liberação.....	19
4	Resultados e Discussão	21
4.1	Caracterização das Nanoesferas	21
4.1.1	Caracterização Morfológica das Nanoesferas	21
4.1.1.1	Experiência 1 a 4.....	21
4.1.1.2	Experiência 5 a 8.....	23
4.1.1.3	Experiência 9 a 12.....	24
4.1.1.4	Experiência 13 a 16.....	26

4.1.2	Caracterização do Tamanho e Potencial Zeta das nanoesferas por Dispersão Dinâmica de luz (DLS)	28
4.1.3	Calorimetria de Varrimento de Diferencial (DSC)	29
4.1.4	Resultado das Variáveis dependentes para cada experiência	30
4.2	Optimização das condições experimentais no Statistica	30
4.2.1	Desenho de Experiências no Statistica	30
4.2.2	Análise do Desenho de experiências no Statistica	31
4.2.2.1	Variável dependente: Tamanho das Nanoesferas	31
4.2.2.2	Variável dependente: Potencial zeta das Nanoesferas	33
4.2.2.3	Variável dependente: carregamento de fármaco	35
4.2.2.4	Variável dependente: Rendimento	37
4.3	Caracterização das partículas otimizadas	39
4.3.1	Caracterização morfológica das nanoesferas	39
4.3.1.1	Esferas tipo A	39
4.3.1.2	Esferas tipo B	41
4.3.2	Resultado das Variáveis dependentes para as esferas A e B	42
4.4	Ensaio de liberação	42
4.4.1	Ensaio de liberação – Esfera tipo A	43
4.4.2	Ensaio de liberação – Esfera tipo B	43
5	Conclusão	45
6	Bibliografia	47
7	Anexos	49

Índice de tabelas

Tabela 2.1 Trabalhos de produção de micro e nanopartículas utilizando desenho de experiências.	11
Tabela 3.1 Limites das variáveis independentes.	16
Tabela 3.2 Desenho de experiências para as variáveis independentes: %PVA (P/V); V_{PVA} (ml); $T_{sonicação}$ (s).	16
Tabela 4.1 Intervalos e valores médios de tamanhos das nanopartículas;	27
Tabela 4.2 Tamanho e Potencial Zeta obtidos por DLS;	28
Tabela 4.3 Variáveis dependentes obtidas nas experiências: Tamanho, potencial zeta, carregamento de fármaco e rendimento.	30
Tabela 4.4 Tabela ANOVA para a variável dependente tamanho	32
Tabela 4.5 Tabela ANOVA condensada para a variável dependente tamanho	32
Tabela 4.6 Tabela ANOVA para a variável dependente potencial zeta.	34
Tabela 4.7 Tabela ANOVA condensada para a variável dependente potencial zeta.	34
Tabela 4.8 Tabela ANOVA para a variável dependente carregamento de fármaco.	35
Tabela 4.9 Tabela ANOVA condensada para a variável dependente carregamento de fármaco.	36
Tabela 4.10 Tabela ANOVA para a variável dependente rendimento.	37
Tabela 4.11 Tabela ANOVA condensada para a variável dependente rendimento.	37
Tabela 4.12 Valor das variáveis independentes.	39
Tabela 4.13 Valor esperado para as variáveis dependentes.	39
Tabela 4.14 Resultado das variáveis dependentes para cada tipo de esfera.	42
Tabela 7.1 Valores da solução padrão.	49

Índice de figuras

Figura 2.1 Formula molecular do poli (ácido láctico-co-glicólico) [5].	5
Figura 2.2 Estrutura do fármaco anticanceroso, Doxorubicina [8].	6
Figura 2.3 Estratégia inicial para o planeamento de experiências.	8
Figura 2.4 Metodologia de superfície de resposta [10].	9
Figura 2.5 Pontos experimentais do planeamento do composto central, para duas variáveis independentes.	10
Figura 4.1 Fotografia (SEM) das Nanoesferas de PLGA com Doxorubicina obtidas para 1,1% PVA: a) Exp1 ($V_{PVA}=7\text{ml}$, $T_{sonic}=40\text{s}$); b) Exp 2 ($V_{PVA}=7\text{ml}$, $T_{sonic}=95\text{s}$); c) Exp 3 ($V_{PVA}=15\text{ml}$, $t_{sonic}=40\text{s}$); d) Exp 4 ($V_{PVA}=15\text{ml}$, $T_{sonic}=95\text{s}$);	22
Figura 4.2 Distribuição de tamanho de esferas para as experiências 1, 2, 3 e 4;	22
Figura 4.3 Fotografia (SEM) das Nanoesferas de PLGA com Doxorubicina obtidas para 3,5% PVA: a) Exp 5 ($V_{PVA}=7\text{ml}$, $T_{sonic}=40\text{s}$); b) Exp 6 ($V_{PVA}=7\text{ml}$, $T_{sonic}=95\text{s}$); c) Exp 7 ($V_{PVA}=15\text{ml}$, $t_{sonic}=40\text{s}$); d) Exp 8 ($V_{PVA}=15\text{ml}$, $T_{sonic}=95\text{s}$);	23
Figura 4.4 Distribuição de tamanho de esferas para as experiências 6, 7 e 8;	24
Figura 4.5 Fotografia (SEM) das Nanoesferas de PLGA com Doxorubicina obtidas para: a) Exp 9 (0,28% PVA, $V_{PVA}=11\text{ml}$, $T_{sonic}=67,5\text{s}$); b) Exp 10 (4,32% PVA, $V_{PVA}=11\text{ml}$, $T_{sonic}=67,5\text{s}$); e para 2,30% PVA: c) Exp 11 ($V_{PVA}=4,27\text{ml}$, $t_{sonic}=67,5\text{s}$); d) Exp 12 ($V_{PVA}=17,7\text{ml}$, $T_{sonic}=67,5\text{s}$);	25
Figura 4.6 Distribuição de tamanho de esferas para as experiências 9, 10, 11 e 12;	25
Figura 4.7 Fotografia (SEM) das Nanoesferas de PLGA com Doxorubicina obtidas para 2,3% PVA e $V_{PVA}=11\text{ml}$: a) Exp 13 ($T_{sonic}=21,3\text{s}$); b) Exp 14 ($T_{sonic}=113,7\text{s}$); c) Exp 15 ($t_{sonic}=67,5\text{s}$); d) Exp 16 ($T_{sonic}=67,5\text{s}$);	26
Figura 4.8 Distribuição de tamanho de esferas para as experiências 13, 14, 15 e 16;	27
Figura 4.9 Termograma obtido por calorimetria de varrimento diferencial (DSC) para o PLGA;	29
Figura 4.10 Gráficos de superfície, para a variável dependente tamanho. o-valores dos limites para as variáveis independentes.	33
Figura 4.11 Gráficos de superfície, para a variável dependente potencial zeta. o-valores dos limites para as variáveis independentes.	35
Figura 4.12 Gráficos de superfície, para a variável dependente, carregamento de fármaco. o-valores dos limites para as variáveis independentes.	36
Figura 4.13 Gráficos de superfície, para a variável dependente rendimento. o-valores dos limites para as variáveis independentes.	38
Figura 4.14 Fotografias das Nanoesferas de PLGA com Doxorubicina obtidas por SEM com uma ampliação a)x10,000 e b)x30,000, para as esferas do tipo A; e c)x10,000 e d)x30,000, para a réplica das esferas do tipo A;	40
Figura 4.15 Distribuição de tamanhos das esferas tipo A;	40
Figura 4.16 Fotografias das Nanoesferas de PLGA com Doxorubicina obtidas por SEM com uma ampliação a)x10,000 e b)x30,000, para as esferas do tipo B; e c)x10,000 e d)x30,000, para a réplica das esferas do tipo B;	41
Figura 4.17 Distribuição de tamanhos das esferas tipo B;	41
Figura 4.18 Percentagem de Doxorubicina em função do tempo para as esferas do tipo A.	43
Figura 4.19 Percentagem de Doxorubicina em função do tempo para as esferas do tipo B.	44
Figura 7.1 Recta de calibração para o cálculo da concentração de Doxorubicina.	49

Lista de símbolos e abreviaturas

DCM	Diclorometano
DLS	Dispersão dinâmica de luz
DOE	Desenho de experiências
DSC	Calorimetria de varrimento diferencial
FDA	US Food and Drugs Organization
PBS	Tampão fosfato salino
PLGA	Poli (lático-co-ácido glicólico)
PVA	Ácido polivinílico
SEM	Microscopia electrónica de varrimento

1 Introdução

A tecnologia de libertação controlada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência que envolve diferentes aspectos multidisciplinares podendo assim contribuir muito para o avanço da saúde humana. Os sistemas de libertação de fármacos oferecem inúmeras vantagens quando comparados com outras formulações convencionais.

Algumas dessas vantagens são:

- I. Maior eficácia terapêutica, com libertação progressiva e controlada do fármaco por difusão na matriz e/ou por degradação da matriz;
- II. Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;
- III. Variedade na natureza e composição dos sistemas que funcionam como protectores do fármaco diminuindo assim a sua instabilidade e decomposição (bio inactivação prematura);
- IV. Administração segura (sem reacções inflamatórias locais) e conveniente (menor numero de doses);
- V. Possibilidade de direccionar os sistemas para alvos específicos;
- VI. Possibilidade de incorporação de substâncias hidrofílicas;

Estas novas estratégias para o transporte do princípio activo incluem aplicações da ciência de colóides nas mais variadas formas tais como emulsões múltiplas e inversas, micro e nanogéis, lipossomas, micro e nanopartículas biodegradáveis, micro e nanocápsulas.

2 Revisão da Literatura

Têm sido feitos importantes avanços em medicina na área de administração de fármacos com o desenvolvimento de formas terapêuticas de liberação controlada. Há uma grande variedade de investigações dedicadas à liberação controlada de fármacos e também às várias propriedades físicas que influenciam a liberação de fármaco.

A finalidade dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração de fármaco no sangue ou nas células alvo no valor desejado o maior tempo possível. Ou seja, eles são capazes de exercer um controle sobre a taxa de liberação de fármaco e sua duração [1]. Assim, é possível obter uma cinética de liberação bem definida de forma a que a concentração desejada de fármaco seja atingida permitindo um tratamento mais eficaz e mais seguro. Estes sistemas são particularmente úteis para a administração de fármaco com efeitos secundários tóxicos como os fármacos anti tumorais.

Os sistemas para liberação controlada de fármaco têm várias vantagens em relação aos métodos convencionais de tratamento. As vantagens fundamentais são: administração segura (sem reacções inflamatórias locais) e conveniente (menor números de doses); possibilidade de direccionamentos para alvos específicos; maior protecção do fármaco à decomposição; diminuição significativa de toxicidade e maior tempo de permanência em circulação; controlo do princípio activo disponível; maior efeito terapêutico, com liberação gradual e controlada do fármaco (Liu et al., 2007).

Exemplos de sistemas de liberação de fármacos que têm sido desenvolvidos são lipossomas, micro e nanopartículas poliméricas, emulsões, micelas poliméricas e fosfolipídicas, nanopartículas metálicas, etc. Estes sistemas podem ser utilizados para vários tipos de compostos como anticorpos, pequenas moléculas, proteínas, etc.

As nanopartículas poliméricas oferecem grande resistência e durabilidade e podem ser produzidas com uma grande variedade de polímeros biocompatíveis, o que lhes confere grande versatilidade de aplicação. Permitem, ainda, a incorporação de vários fármacos e a funcionalização da sua elevada área superficial com moléculas de reconhecimento de células alvo. As nanopartículas, devido ao seu tamanho, têm a capacidade de extravasar os vasos sanguíneos junto dos tumores e por isso são particularmente vantajosas no tratamento de doenças oncológicas.

2.1 Material polimérico

A aplicação de materiais poliméricos para utilização médica tem tido um rápido crescimento e tem sido evidenciada em diversos campos como engenharia de tecidos, implantes de dispositivos médicos e órgãos artificiais, próteses, oftalmologia, odontologia, regeneração óssea e outros.

Sistemas poliméricos de liberação de fármacos são largamente utilizados e não só permitem uma liberação lenta e gradual do ingrediente ativo, como também podem possibilitar o direcionamento a alvos específicos do organismo, como sítios de inflamação ou tumor. Os polímeros biologicamente degradáveis incluem [4]:

- I. Polímeros naturais: são sempre biodegradáveis como, por exemplo, a celulose e o quitosano e são muito utilizados como matrizes em liberação de fármacos.
- II. Polímeros naturais modificados: um problema encontrado em polímeros naturais é o seu longo tempo de degradação, o que pode ser resolvido adicionando-se grupos polares às cadeias, que por serem mais lábeis podem diminuir o tempo de degradação. Outro problema encontrado é a sua elevada solubilidade em água. Neste caso podem ser modificados por reticulação; Ex: reticulação de gelatina com formaldeído ou de quitosano com glutaraldeído. Modificações enzimáticas também são utilizadas, como a modificação de quitosano por tirosinase.
- III. Polímeros sintéticos: são também largamente utilizados, como, por exemplo, poli (etileno), poli (álcool vinílico), poli (ácido acrílico), poli (acrilamidas), poli (etinoglicol), poliésteres. No caso dos poliésteres, podem ser constituídos por um polímero alifático linear mais simples, como por exemplo o ácido poli glicólico. O monômero é sintetizado a partir da dimerização do ácido glicólico e a polimerização por abertura do anel permite obter materiais de alta massa molar, com aproximadamente 1-3% do monômero residual. Os co polímeros de ácido glicólico com ácido l-láctico e ácido dl-láctico são os mais utilizados em sistemas de liberação controlada, pois apresentam muitas vantagens tais como menor tempo de degradação. Este menor tempo de degradação explica-se pela amorfização provocada pela quebra da regularidade entre as cadeias na presença do monômero em co polímeros de ácido l-láctico com 25-70% em ácido glicólico.

A biodegradabilidade dos polímeros é a capacidade de um material ser degradado sob a acção de elementos vivos, sendo necessário levar em consideração o meio onde ocorrem as reacções para que a biodegradação aconteça. Neste meio devem ser considerados todos os parâmetros físicos (temperatura, pressão...), a composição química do meio, além dos parâmetros biológicos (acção dos animais, microorganismos...) que se mostram interdependentes. Actualmente, os polímeros biodegradáveis com durabilidade em uso e degradabilidade após o uso, têm tido um crescente destaque.

Nas últimas décadas, o Poli (ácido láctico-co- glicólico) (PLGA) tem recebido grande interesse na área médica e farmacêutica devido à sua biodegradabilidade, segurança toxicológica, boa biocompatibilidade e com taxa de degradação regulável [2]. É um dos poucos aprovados para uso clínico em humanos [3]. Hoje em dia, o PLGA é amplamente aplicado em sistemas

parentéricos de entrega controlada de fármacos, incluindo nano- e micropartículas, bem como implantes e suportes para a engenharia de tecidos [6].

A utilização de PLGA em sistemas de libertação controlada de fármacos tem diversas vantagens que incluem a possibilidade de controlar a taxa de libertação em períodos que podem variar de alguns dias a vários meses e a fácil administração. Os parâmetros de formulação podem variar a fim de ajustar os padrões de libertação de fármaco, incluindo o peso molecular do polímero, tamanho das nanopartículas, e quantidade de fármaco [3].

A estrutura do polímero em estudo, o PLGA (poli (ácido láctico-co-glicólico)), encontra-se representada na figura 2.1.

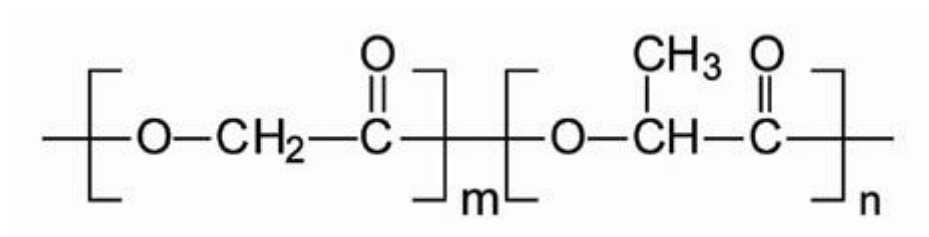


Figura 2.1 Formula molecular do poli (ácido láctico-co-glicólico) [5].

2.2 *Fármaco anti tumoral modelo: Doxorubicina*

A Doxorubicina (estrutura apresentada na figura 2.2) é um antibiótico do grupo das antraciclinas que exerce os seus efeitos sobre as células tumorais através de dois mecanismos diferentes. Ele actua como agente intercalando ente as bases de ADN, bloqueando assim a síntese de ADN e a sua transcrição. O fármaco também inibe a actividade de uma enzima, a topoisomerase tipo II levando à quebra do ADN genómico. Ambos os mecanismos resultam na interrupção do ADN, o que em última análise pode levar à morte das células.

A Doxorubicina é útil numa ampla gama de cancros sendo que poucos tipos de cancro não respondem ao medicamento. A Doxorubicina é utilizada no tratamento do linfoma de Hodgkin e não-hodgkin, cancro da mama, cancro dos ovários, cancro testicular, leucemia aguda, sarcoma de tecidos moles, cancro de pulmões, cancro da bexiga, cancro gástrico (estomago), cancro de tiróide, hepatoma, tumor de Wilms e neuroblastoma. Em 2007, a FDA também aprovou a Doxorubicina em combinação com o bortezomib para o tratamento do mieloma múltiplo [7].

A Doxorubicina administrada por via intravenosa é o fármaco modelo utilizado neste trabalho.

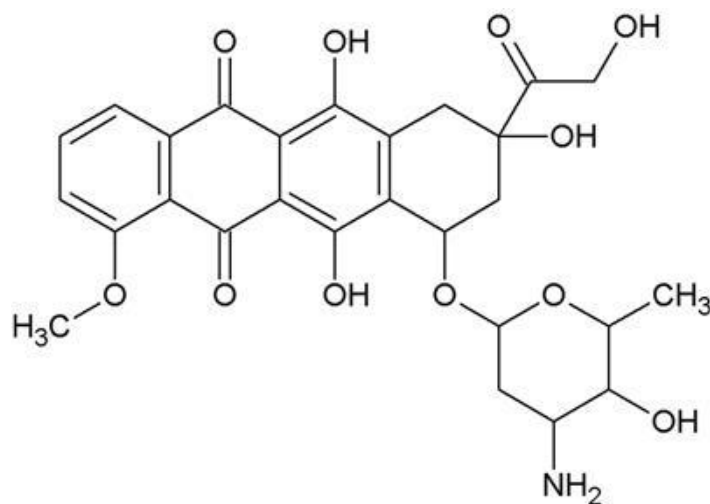


Figura 2.2 Estrutura do fármaco anticanceroso, Doxorubicina [8].

2.3 Cinética de Liberação

As cinéticas de liberação podem ser de três tipos:

- Cinética de ordem zero
A velocidade de liberação permanece constante até que liberte todo o fármaco. É independente da quantidade de fármaco presente na formulação;
- Cinética de meia ordem
A velocidade de liberação decresce proporcionalmente à raiz quadrada do tempo;
- Cinética de primeira ordem
A velocidade de liberação é proporcional à quantidade de fármaco que existe na formulação e pode ser caracterizada através de um decréscimo exponencial com o tempo.

A cinética de liberação depende da difusividade do fármaco no polímero, da geometria e tamanho da matriz, da quantidade de fármaco incorporado no interior dessa matriz e se há ou não degradação ou erosão da partícula.

2.4 Método de produção de nanopartículas

Têm sido utilizados vários métodos de produção de nanopartículas poliméricas tais como o método de extracção/evaporação por solvente, o de precipitação, o de coacervação, por atomização e secagem (spray-dryer) e métodos utilizando tecnologia supercrítica. No entanto, o mais utilizado tem sido o método de extracção/evaporação por solvente no qual uma fase orgânica contendo polímero e o fármaco é dispersa numa solução aquosa contendo um emulsificante sob forte agitação originando uma emulsão óleo em água (o/w). Esta emulsão é adicionada a uma solução aquosa contendo o emulsificante e deixada sob agitação magnética por 24h. Durante este tempo, o solvente orgânico é extraído para a fase aquosa e evaporado permitindo a precipitação do polímero como micro ou nanopartícula contendo no seu interior o fármaco.

No processo de produção das nanopartículas pelo método de extracção/evaporação por solvente, os parâmetros experimentais que têm mostrado uma maior influência sobre o tamanho das nanopartículas e o carregamento do fármaco são a razão de volume entre as fases orgânica e aquosa, a concentração do estabilizante da emulsão e o método e duração de agitação.

O objectivo do presente trabalho é produzir nanopartículas poliméricas de PLGA com Doxorubicina pelo método de extracção/evaporação por solvente e estudar o efeito dos parâmetros de síntese sobre o tamanho das partículas e a sua estabilidade (potencial zeta), a percentagem de incorporação do fármaco nas nanopartículas e o rendimento do processo.

De forma a reduzir o grande número de experiências a realizar para os 3 parâmetros operacionais, utilizou-se um planeamento de experiências (DOE). A aplicação do método DOE em optimização do processamento de nanopartículas é benéfica, particularmente devido ao alto custo de experimentação e de complexas estruturas de erro aleatório [4].

2.5 Desenho de Experiências

Para o desenho de experiências é fundamental conhecer as variáveis independentes importantes para os estudos a realizar, assim como os valores dos seus limites inferior e superior.

Algumas experiências devem ser realizadas a fim de se obter dados sobre as variáveis dependentes. A partir desses resultados, devem ser utilizadas técnicas estatísticas de modo a poder determinar a relação de dependência das variáveis independentes com as variáveis dependentes. O desenho de experiências é uma dessas técnicas, que actualmente é usada em grande escala e que permite determinar as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, tendo como resultados [9]:

1. Redução da variação do processo e melhor concordância entre os valores nominais obtidos e os valores pretendidos;
2. Redução do tempo do processo;
3. Redução do custo operacional;
4. Melhoria no rendimento do processo.

Entende-se por experiência (ou ensaio) um teste no qual se efectuam, propositadamente, alterações de certas variáveis ou parâmetros do processo (os factores) para observar as mudanças que ocorrem numa ou mais características da unidade experimental e identificar as respectivas causas. Designa-se por unidade experimental a entidade na qual são feitas as medições de uma ou mais características. Os factores podem ser controláveis ou não. Considera-se um factor controlável, uma variável cujos valores são alterados pelos investigadores com o intuito de determinar o efeito numa ou mais respostas. Os valores que o factor assume designam-se por níveis (ou tratamentos), podendo estes ser qualitativos ou quantitativos. O efeito de um factor é a alteração média observada na resposta quando o factor muda de nível. Designa-se resposta o resultado de uma experiência, ou seja, a resposta será a característica da qualidade que os investigadores estão interessados em otimizar. Qualquer desenho ou planeamento de experiências requer, antes da sua execução, uma abordagem sistemática para que a sua aplicação conduza a resultados positivos e encontra-se esquematizado na figura seguinte [9].

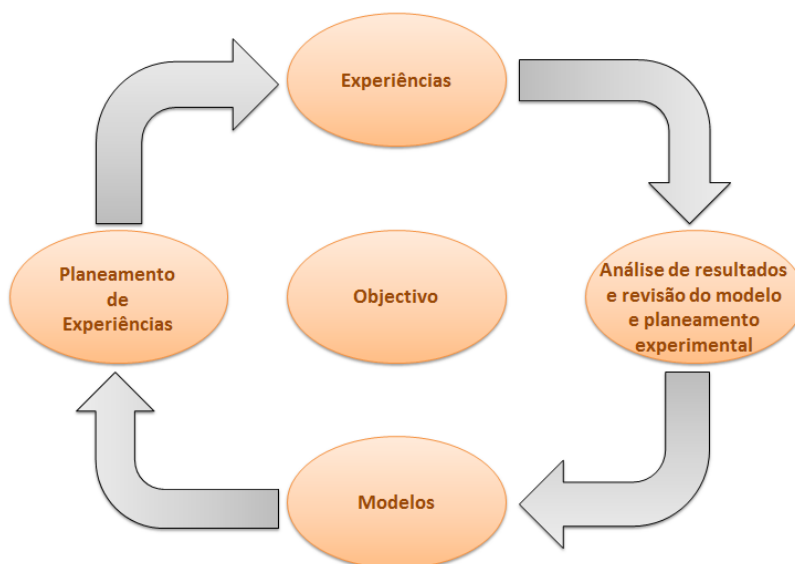


Figura 2.3 Estratégia inicial para o planeamento de experiências.

Após a realização dos ensaios, deve utilizar-se por princípio, a análise de variância para tratamento de resultados obtidos. Esta permite determinar de forma objectiva quais os factores e/ou interações que afectam significativamente a(s) resposta(s); posteriormente, é possível determinar a combinação de níveis que conduz à maximização dos objectivos pré-estabelecidos.

Existem vários tipos de planeamento de experiências:

- Desenho com um factor a vários níveis;
- Desenho factorial completo;
- Desenho factorial fraccionado;
- Método de Taguchi;
- Otimização simplex;
- Metodologia de superfície de resposta;

No estudo presente vai ser avaliada a metodologia de superfície de resposta.

2.5.1 Metodologia de superfície de resposta

Usam-se superfícies de resposta quando as variáveis de resposta são influenciadas por muitas variáveis independentes e o objectivo é otimizar essas respostas [9]. Se os investigadores querem maximizar uma variável de resposta de um determinado processo que seja função de dois factores, x_1 e x_2 , utilizam a seguinte equação.

$$y = f(x_1, x_2) + \varepsilon \quad (1)$$

Sendo ε o erro observado ou o ruído da resposta y . A superfície que representa a equação 1 é chamada superfície de resposta.

A primeira etapa no uso da metodologia de superfície de resposta é determinar a relação matemática entre a variável resposta e as variáveis independentes. É claro que a primeira relação a ser pensada é a mais simples, como uma recta. Se esse polinómio de menor grau ajustar bem a resposta, então a função será dada por um modelo chamado de modelo de primeira ordem.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (2)$$

Se houver curvatura no sistema, então o modelo de segunda ordem ou quadrática deverá ajustar-se melhor aos dados, ficando-se com:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \varepsilon \quad (3)$$

O procedimento de uso do método de superfície de resposta é sequencial, isto é, quando se inicia o estudo e se está longe do ponto óptimo da resposta, os dados são bem ajustados para um modelo de primeira ordem. Mas como se pretende determinar o ponto óptimo, deve-se procurar uma estratégia eficiente de rapidamente se encontrar as condições operacionais ideais que levem a isso. Uma vez encontrada a possível região onde o ponto óptimo está, deverá ser adoptado um modelo de segunda ordem, para se poder encontrar o ponto óptimo nessa região. A figura 2.4 apresenta a metodologia que foi descrita.

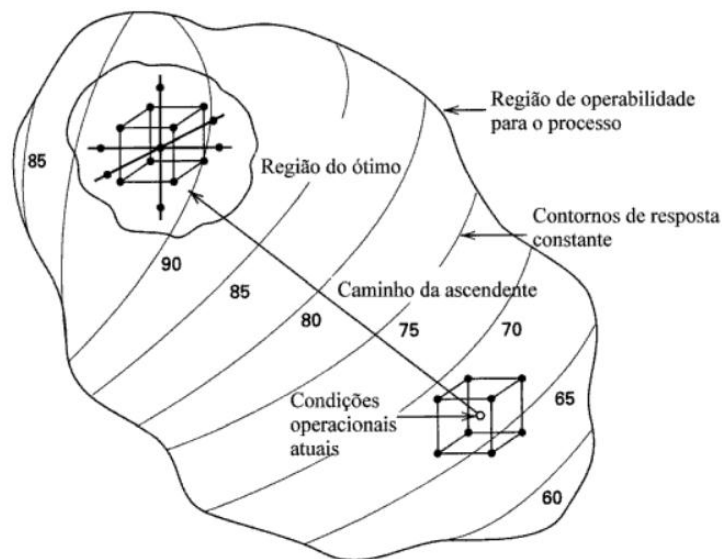


Figura 2.4 Metodologia de superfície de resposta [10].

2.5.2 Desenho de experiências usando o método do composto central

O planeamento do composto central deve ser utilizado quando se pretende verificar a curvatura de um plano, ou seja, quando se pretende verificar a existência de termos quadráticos no modelo de regressão.

Este tipo de planeamento consiste numa parte referente ao planeamento factorial 2^k (ou de um planeamento fraccionário, com resolução V), com n_f orientações, $2k$ orientações axiais ou estrela e n_c orientações centrais. A figura 2.5 apresenta os pontos do planeamento do composto central para o caso de 2 factores [9].

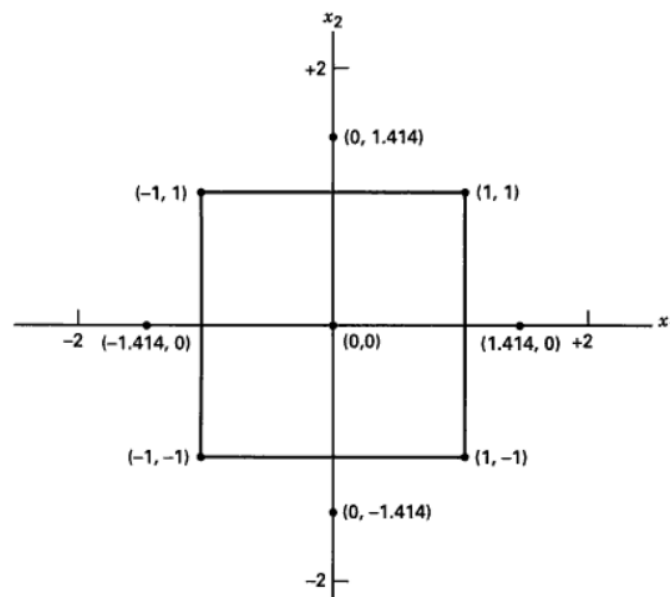


Figura 2.5 Pontos experimentais do planeamento do composto central, para duas variáveis independentes.

Quatro diferentes modelos podem ser testados sequencialmente no planeamento composto central:

- Somente Termos Lineares dos Efeitos Principais;
- Termos Lineares e Quadráticos dos Efeitos Principais;
- Termos Lineares dos Efeitos Principais e Interações de Segunda Ordem;
- Termos Lineares e Quadráticos dos Efeitos Principais e Interações de Segunda Ordem.

Neste tipo de planeamento, existem dois parâmetros que devem ser especificados: a distância α a partir do centro do planeamento até aos pontos axiais e o número de pontos centrais n_c .

O parâmetro α é chamado de *rotabilidade*. É importante para o modelo de segunda ordem fornecer previsões, através da região de interesse, que tenham uma variância razoavelmente consistente e estável nos pontos de interesse das variáveis independentes. Box e Hunter afirmaram que a superfície de resposta de segunda ordem deve ser rotacionável. Isso significa que a variância do valor previsto para a resposta é a mesma em todos os pontos das variáveis independentes que estejam à mesma distância do centro de planeamento. [9] Ou seja, a variância da resposta prevista é constante nas esferas.

O planeamento do composto central pode se tornar rotacionável dependendo do valor de α , que por sua vez depende do numero de pontos na porção factorial do planeamento. Ele é dado por $\alpha = (n_F)^{1/4}$. Na realidade, o valor α é ditado principalmente pela região de interesse.

A rotabilidade é uma propriedade esférica, isto é, é um critério do método, usado quando a região de interesse é uma esfera. No entanto, não é importante ter uma rotabilidade exacta para se ter um bom planeamento. Na verdade, para uma região esférica de interesse, a melhor escolha de α , de um ponto de vista de previsão de variância, é estabelecê-la igual a $k^{1/2}$. Todos os pontos do planeamento factorial e axial ficam sobre uma esfera tendo o planeamento que incluir pontos centrais a fim de prover uma variância razoavelmente estável da resposta prevista. Geralmente recomenda-se usar de três a cinco pontos centrais.

Uma outra característica de qualquer planeamento é ser ortogonal. O cálculo de α de modo a tornar o planeamento ortogonal é dada pela equação (4):

$$\alpha = \left\{ \left[(n_F + n_A + n_C)^{1/2} - n_F^{1/2} \right]^2 \frac{n_F}{4} \right\}^{1/4} \quad (4)$$

Sendo n_F , n_A e n_C o numero de pontos nas porções factorial, axial (ou estrela) e central, respectivamente. No caso de haver blocos, α é calculado por:

$$\alpha = \left[k \left(\frac{1+n_{CA}/n_A}{1+n_{CF}/n_F} \right) \right]^2 \quad (5)$$

Em que n_{CA} e n_{CF} são o numero de pontos centrais nas porções axiais e factorial do planeamento.

Na tabela 2.1 encontram-se listados trabalhos de produção de micro e nano partículas utilizando desenho de experiências existentes na literatura.

Tabela 2.1 Trabalhos de produção de micro e nanopartículas utilizando desenho de experiências.

<i>Tipo de Partículas</i>	<i>Variáveis</i>	<i>Resultados</i>	<i>Referência</i>
-Nanopartículas de PLGA -siRNA (small interfering RNA)	Parâmetros: -Concentração de nanopartículas e excipiente na alimentação (mg/ml) -Proporção nanopartículas com excipiente (%p/p) -Excipiente (subs. farmacologicamente inactiva) (Manitol, Lactose e Trealose) Respostas: -Rendimento -Teor de humidade no pó -Morfologia da partícula -Tamanho aerodinâmico de partícula	-Os produtos produzidos com lactose e trealose possuíam características semelhantes. O manitol mudou os efeitos exercidos pela proporção e um pouco pela concentração.	[7]

<i>Tipo de Partículas</i>	<i>Variáveis</i>	<i>Resultados</i>	<i>Referência</i>
-Nanopartículas de PEG-PLGA-PEG -Mitoxantrone (MIT)	Parâmetros: -Quantidade de polímero -Concentração de MIT -Proporção de fase orgânica com fase aquosa Respostas: -Tamanho da Nanopartículas -Percentagem de incorporação do fármaco	-Tamanho da Nanopartículas varia entre 99,47 a 680,7 nm, tendo a maioria 99,47 a 188,2 nm; -Percentagem de incorporação foi de 40% a 90,23%; -Nanopartículas esféricas, discretas, sem agregação, superfície morfológica lisa; -Condições ideais para a produção de PEG-PLGA-PEG com MIT em relação ao tamanho e % incorporação: PEG-PLGA-PEG com 9 mg/ml, MIT com 27,5 mg/ml e uma proporção de 17/2 (v/v).	[10]
-Microesferas de PLGA	Parâmetros: -Temperatura -Velocidade de agitação -Concentração de PLGA -Concentração de surfactante Respostas: -Tamanho das micropartículas (PLGA) -Polidispersão de microesferas	-Morfologia de PLGA: Partículas esféricas, com uma superfície lisa, sem poros ou cavidades; -Tamanho médio das microesferas: 2,7 a 19,7 µm;	[11]
-Nano partículas super paramagnéticas de Óxido de ferro	Parâmetros: -Velocidade de agitação -Molaridade Respostas: -Tamanho de partículas -Propriedades magnéticas	-Molaridades entre 1,3-1,4 e as taxas de homogeneidade entra 7200-9000 rpm parecem fornecer uma gama estável para a produção de nanopartículas de magnetite com tamanho de partículas semelhante e com PVA.	[12]
- Nano partículas de dialquilaminoalquil-amina-poli (álcool vinílico) -g-poli (ácido láctico-co-glicólico) carregado com insulina	Parâmetros: -Concentração de polímero -Concentração de insulina no nano complexo Respostas: -Eficiência de encapsulamento -Rendimento -Potencial zeta -Tamanho de partícula	- O potencial zeta não foi significativamente influenciado pelos dois parâmetros em estudo; -Para cada concentração de polímero a eficiência de encapsulação aumentou com o aumento de insulina no nano complexo, até um máximo. Paradoxalmente, as eficiências de encapsulamento menor foram encontradas com as maiores concentrações de polímero; -O rendimento é significativamente influenciado pela concentração de insulina no nano complexo;	[13]
- Microesferas de poli (DL-ácido láctico) carregadas com insulina	Parâmetros: - Peso molecular do polímero -Quantidade de insulina -Concentração de Álcool polivinílico (PVA) Respostas: -Eficiência de encapsulamento -Rendimento -Tamanho de partícula -Rutura da partícula	-O tamanho da partícula não depende de nenhuma variável; -Quando há uma menor concentração de insulina e menor concentração de PVA, existe um menor efeito de ruptura e um maior efeito na eficiência de encapsulamento, mas também uma diminuição na taxa de liberação;	[14]

<i>Tipo de Partículas</i>	<i>Variáveis</i>	<i>Resultados</i>	<i>Referência</i>
- Nanopartículas de Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)	Parâmetros: -Polímeros -concentração de PVA (2 níveis (antes e depois de liofilizar)) Respostas: -Potencial zeta -Tamanho da partícula	- Sem o PVA o tamanho das partículas aumentou 1 μm . -Os valores do potencial zeta foram ligeiramente negativos, os valores mais extremistas do potencial zeta foram obtidos quando o poloxamer e o carbopol foram utilizados.	[15]
- Nanopartículas de Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)	Parâmetros: -Numero de ciclos de homogeneização -Adição de ácido bórico -Concentração ciprofloxacina -Óleo Respostas: -Potencial zeta -Tamanho da partícula -Eficiência de carregamento do fármaco -Libertação do fármaco	-A homogeneização diminuiu o tamanho da partícula e a taxa de liberação de ciprofloxacina, mas aumentou a eficiência de encapsulamento. -A adição de ácido bórico aumentou a taxa de liberação de fármacos. -A razão O/W influenciou a taxa de liberação de fármaco, sendo que a liberação do fármaco foi mais rápida quando o volume da fase orgânica era maior.	[16]

Uma vez que a velocidade de liberação de fármaco é determinada pelas propriedades das nanopartículas, sendo as mais importantes o tamanho e o grau de carregamento de fármaco, estas últimas foram escolhidas como variáveis dependentes. As outras variáveis dependentes escolhidas estão relacionadas com a eficiência do processo de produção e de armazenamento, nomeadamente o rendimento e o potencial zeta, respectivamente. Assim, as variáveis dependentes escolhidas são: tamanho, potencial zeta, carregamento de fármaco nas partículas e rendimento da produção de partículas. As variáveis independentes consideradas neste trabalho são a concentração de ácido polivinílico (PVA) (%P/V) na solução aquosa da primeira emulsão (% PVA), o volume de solução de PVA (ml) adicionado na formulação da primeira emulsão (V_{PVA}) e o tempo de sonicação (s) ($T_{\text{sonicação}}$).

3 *Materiais e Métodos*

3.1 *Materiais*

Para a formação da nanopartículas, foi utilizado o polímero Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e como emulsificante o ácido Polivinílico (PVA), ambos fornecidos pela Sigma-Aldrich.

Como solventes foram utilizados o diclorometano e a acetona, com graus de pureza de 99,9% e 95%, respectivamente, tendo sido fornecidos pela Fluka (Alemanha).

A Doxorubicina foi fornecida pela Sigma.

Para a concretização dos ensaios de liberação, foi utilizado uma solução tampão de PBS, tampão fosfato salino, que foi fornecida pela Fluka (Alemanha).

3.2 *Métodos*

Foram produzidas partículas de PLGA com Doxorubicina, pelo método de evaporação/extracção de solvente variando a concentração de PVA, o volume de PVA e o tempo de sonicação.

3.2.1 *Preparação de nanopartículas*

3.2.1.1 *Desenho de experiências para a preparação de nanopartículas de PLGA com Doxorubicina*

O modelo de planeamento de experiências escolhido para este estudo foi o desenho de experiências do composto central. A optimização das condições experimentais na preparação das Nanoesferas de PLGA foi feita no programa estatística STATISTICA 8 da StatSoft, utilizando-se o Design & Análise de experiências do composto central (superfície de Resposta) [10].

As variáveis dependentes usadas neste trabalho, por se considerar que são as que maior influência terão sobre a estabilidade das nanopartículas e a velocidade de liberação do fármaco, são:

Este capítulo contém excertos e imagens retirados de diversos artigos assim como procedimentos experimentais baseados em artigos já publicados, disponíveis on-line na “Biblioteca do Conhecimento On-line”. Os mesmos são reproduzidos com autorização do autor e sujeito aos direitos de autor impostos pelo mesmo.

- Tamanho (nm)
- Potencial Zeta (mV)
- Carregamento de fármaco (% p/p)
- Rendimento (% p/p)

Como variáveis independentes foram escolhidas três variáveis que, em estudos preliminares, mostraram maior influência sobre as características das partículas:

- Concentração de PVA (% P/V) na solução aquosa da primeira emulsão (% PVA)
- Volume de solução de PVA (ml) adicionado na formulação da primeira emulsão (V_{PVA})
- Tempo de sonicação (s) do processo de emulsificação ($T_{sonicação}$)

Os valores dos limites escolhidos para as variáveis independentes, seleccionados a partir de resultados preliminares, são apresentados na tabela 3.1. Foram também determinados os valores máximos e mínimos para os valores fora do intervalo utilizando um valor de α de 1,682. [17]

O planeamento de experiências encontra-se na tabela 3.2, onde se apresentam os valores utilizados para cada variável independente.

Tabela 3.1 Limites das variáveis independentes.

Variável independente	α Inferior	Limite mínimo	Limite médio	Limite máximo	α Máximo
% PVA (P/V)	0,28	1,1	2,3	3,5	4,3
V_{PVA} (ml)	4,3	7	11	15	17,7
$T_{sonicação}$ (s)	21,2	40	67,5	95	113,8

Tabela 3.2 Desenho de experiências para as variáveis independentes: %PVA (P/V); V_{PVA} (ml); $T_{sonicação}$ (s).

	% PVA (P/V)	V_{PVA} (ml)	$T_{sonicação}$ (s)
Exp 1	1,10	7,00	40,00
Exp 2	1,10	7,00	95,00
Exp 3	1,10	15,00	40,00
Exp 4	1,10	15,00	95,00
Exp 5	3,50	7,00	40,00
Exp 6	3,50	7,00	95,00
Exp 7	3,50	15,00	40,00
Exp 8	3,50	15,00	95,00
Exp 9	0,28	11,00	67,50
Exp 10	4,32	11,00	67,50
Exp 11	2,30	4,27	67,50
Exp 12	2,30	17,70	67,50
Exp 13	2,30	11,00	21,20
Exp 14	2,30	11,00	113,70
Exp 15	2,30	11,00	67,50
Exp 16	2,30	11,00	67,50

3.2.1.2 Preparação de nanopartículas com Doxorubicina

Preparou-se uma solução de 25mg de PLGA e 2,5mg de Doxorubicina em 500µl de acetona e 750µl de diclorometano. Esta solução foi adicionada a uma solução de PVA tendo a emulsão resultante sido sujeita a sonicação a uma potência de 2000W por um determinado tempo. A nanoemulsão resultante foi adicionada a 25 ml de PVA com concentração de 0,25% W/V sob ligeira agitação magnética. Decorridas 24 horas de agitação, centrifugou-se a mistura a uma velocidade de 10000rpm (Sartorius, Sigma 4K15), durante 4 minutos. De seguida, retirou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado 3 vezes com água. O precipitado obtido foi liofilizado.

Foram preparadas 16 formulações com diferente concentração de PVA, volume de PVA usado na 1ª emulsão e tempo de sonicação. Os valores utilizados encontram-se na tabela 3.2.

3.2.2 Caracterização das nanopartículas

3.2.2.1 Caracterização Morfológica das Nanopartículas por Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

A caracterização morfológica das nanopartículas foi realizada por microscopia electrónica de varrimento (SEM), utilizando um microscópio ZEISS 960. As partículas foram colocadas numa fita adesiva e cobertas com uma fina camada de ouro/paládio.

3.2.2.2 Caracterização do tamanho e carga superficial por Dispersão Dinâmica de luz (DLS)

Os valores do Potencial Zeta e do tamanho das nanopartículas foram obtidos por Dispersão Dinâmica de Luz (DLS) (Zeta Sider-Nano Series, Model Nano-zs from Malvern Instrumentals). As nanopartículas liofilizadas foram ressuspensas em PVA antes da medição.

3.2.2.3 Caracterização de Propriedades Cristalinas por Calorimetria de Varrimento Diferencial (DSC)

As temperaturas de transição vítrea do polímero de PLGA, foram obtidas por Calorimetria de Varrimento Diferencial (DSC), usando Setaram DSC131, equipado com um sistema de análise de dados térmicos. Amostras de 10 mg foram colocadas em recipientes de alumínio, seladas e aquecidas de -20°C a 80°C com uma taxa de aquecimento de 5°C/min sob uma atmosfera de azoto.

3.2.2.4 Carregamento de doxorubicina

A doxorubicina foi quantificada por espectrofotometria de U.V, ao comprimento de onda de 482nm no espectrofotómetro Ultrospec 3100 Pro UV/visible.

A concentração de Doxorubicina na amostra foi calculada utilizando uma recta de calibração previamente determinada a partir de soluções padrão de Doxorubicina as concentrações encontram-se no anexo 1.

A massa de fármaco na partícula foi obtida pesando-se aproximadamente 1mg ou 5mg, dependendo da quantidade obtida de partículas, e dissolvendo-se em 5ml de diclorometano. Posteriormente juntou-se 4ml de água para o polímero precipitar na superfície e com o sobrenadante efectuar-se a leitura no espectrofotómetro. Só depois foi possível quantificar a quantidade de massa de fármaco na partícula.

A percentagem de carregamento de fármaco nas nanopartículas foi calculada utilizando a equação (6):

$$\text{Carregamento de farmaco (\%)} = \frac{\text{massa de farmaco na partícula}}{\text{massa de partícula}} \times 100 \quad (6)$$

3.2.2.5 Rendimento das partículas

O rendimento das partículas foi calculado a partir da seguinte equação:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa de partículas obtida}}{(\text{massa de polímero} + \text{massa farmaco})_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (7)$$

3.2.3 Ensaios de Libertação

Os gráficos representando as variáveis independentes em função das variáveis dependentes obtidos no programa Statistica foram analisados tendo-se escolhido as variáveis dependentes ótimas. Foram então produzidas partículas para dois conjuntos de condições ótimas. Foram realizados ensaios de libertação de fármaco para os dois tipos de partículas produzidas.

Assim, pesaram-se 8mg de nanopartículas contendo fármaco num tubo ao qual foram adicionados 7ml de tampão PBS (pH=7,4). Os tubos de amostra foram colocados numa incubadora a uma temperatura de 37°C e a uma velocidade de agitação de 120rpm.

Foram recolhidas amostras a determinados intervalos de tempo e medida a concentração do fármaco nas amostras. As amostras foram centrifugadas durante 6 minutos a uma velocidade de 11000rpm. Retiraram-se 6ml do sobrenadante e juntaram-se 6ml de tampão PBS fresco ao tubo de amostra contendo as nanopartículas. O tubo foi colocado de novo na incubadora. O sobrenadante foi analisado por espectrofotometria para a determinação da concentração de fármaco, de acordo com 3.2.2.4.

A percentagem de Doxorubicina libertada foi obtida a partir de medições da concentração de fármaco, efectuadas ao longo do tempo, utilizando a equação seguinte.

$$\%Doxorubicina\ libertada = \frac{Massa\ acumulada\ de\ farmaco\ libertada}{Massa\ de\ farmaco\ inicial} \times 100 \quad (8)$$

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterização das Nanoesferas

As esferas de PLGA com Doxorubicina obtidas foram caracterizadas em termos morfológicos, por microscopia electrónica de varrimento (SEM) e em relação às propriedades cristalinas, por calorimetria de varrimento diferencial (DSC). Apresentam-se em seguida os resultados obtidos.

4.1.1 Caracterização Morfológica das Nanoesferas

As fotografias das esferas de PLGA com o fármaco Doxorubicina, para as várias experiências realizadas, onde se alteraram as variáveis independentes (% PVA, V_{PVA} , $T_{sonicação}$), obtidas por microscopia estão representadas nas figuras 4.1, 4.3, 4.5 e 4.7.

4.1.1.1 Experiência 1 a 4

Esferas de PLGA com Doxorubicina, nas condições seguintes:

	% PVA (P/V)	V_{PVA} (ml)	$T_{sonicação}$ (s)
Exp 1	1,10	7,00	40,00
Exp 2	1,10	7,00	95,00
Exp 3	1,10	15,00	40,00
Exp 4	1,10	15,00	95,00

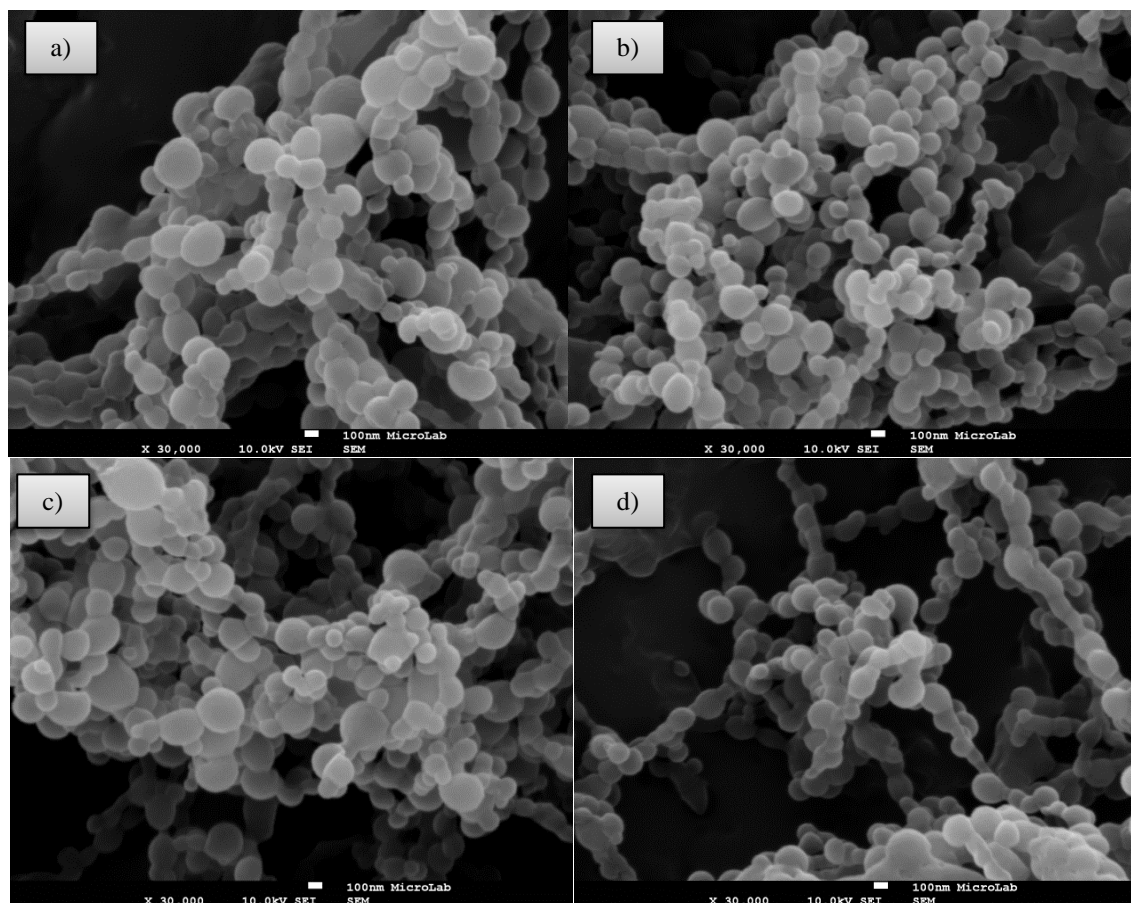


Figura 4.1 Fotografia (SEM) das Nanoesferas de PLGA com Doxorubicina obtidas para 1,1% PVA: a) Exp1 ($V_{PVA}=7\text{ml}$, $T_{sonic}=40\text{s}$); b) Exp 2 ($V_{PVA}=7\text{ml}$, $T_{sonic}=95\text{s}$); c) Exp 3 ($V_{PVA}=15\text{ml}$, $t_{sonic}=40\text{s}$); d) Exp 4 ($V_{PVA}=15\text{ml}$, $T_{sonic}=95\text{s}$);

Observando a figura 4.1, verifica-se que as partículas obtidas têm uma forma esférica apresentando uma superfície lisa, o seu aspecto é uniforme homogêneo e encontram-se dispersas. As esferas apresentam um tamanho que varia entre 100 nm e 500 nm, de acordo com as medições efectuadas manualmente a partir das fotografias obtidas. O gráfico de distribuição de tamanhos encontra-se na figura 4.2.

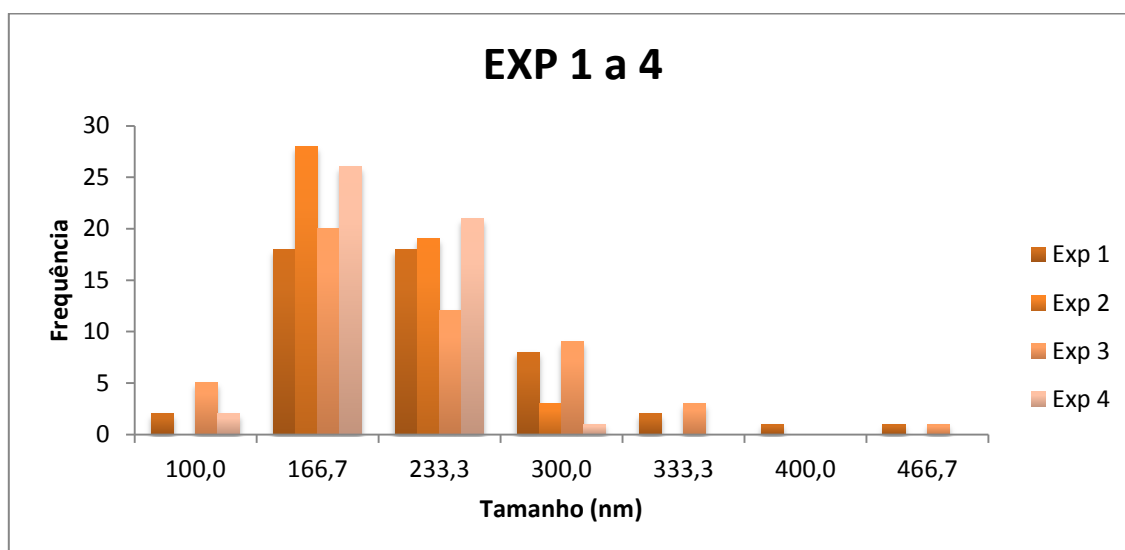


Figura 4.2 Distribuição de tamanho de esferas para as experiências 1, 2, 3 e 4;

4.1.1.2 Experiência 5 a 8

Esferas de PLGA com Doxorubicina, nas condições seguintes:

	% PVA (P/V)	V _{PVA} (ml)	T _{sonicação} (s)
Exp 5	3,50	7,00	40,00
Exp 6	3,50	7,00	95,00
Exp 7	3,50	15,00	40,00
Exp 8	3,50	15,00	95,00

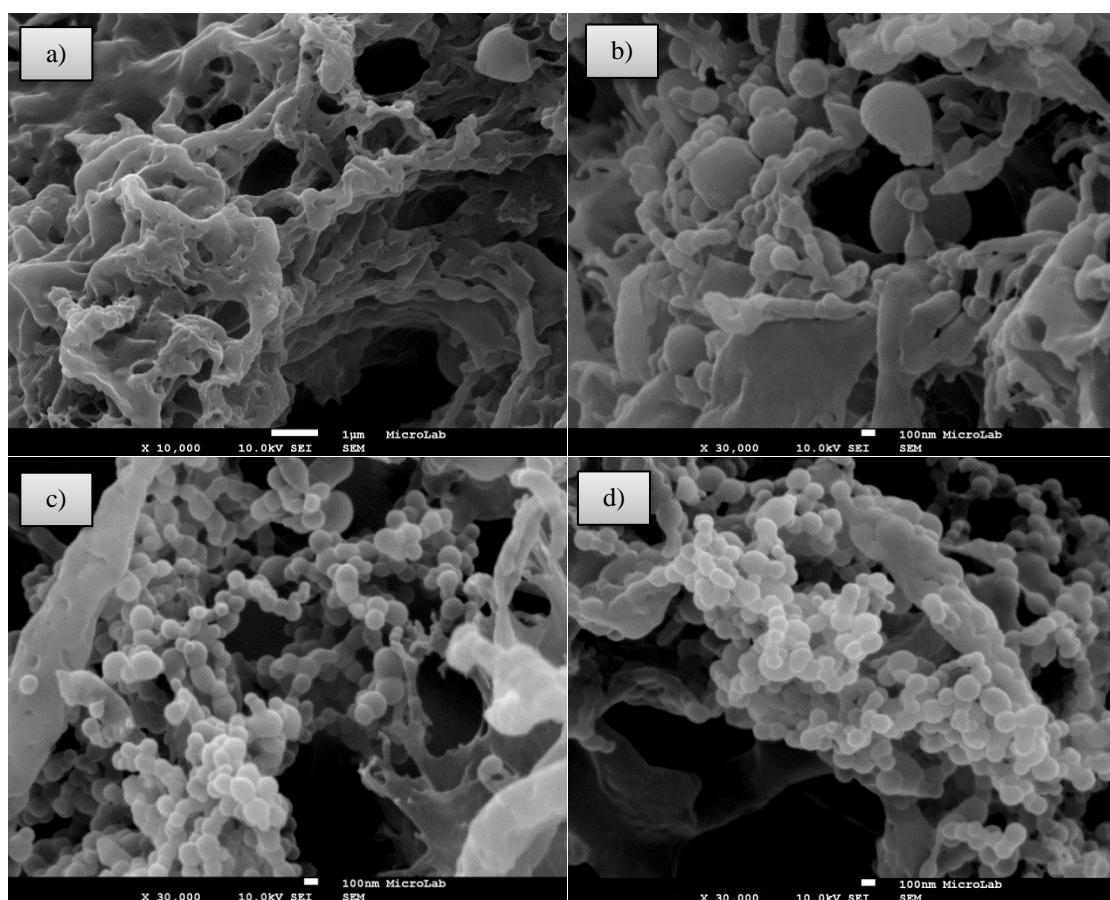


Figura 4.3 Fotografia (SEM) das Nanoesferas de PLGA com Doxorubicina obtidas para 3,5% PVA: a) Exp 5 (V_{PVA}=7ml, T_{sonic}=40s); b) Exp 6 (V_{PVA}=7ml, T_{sonic}=95s); c) Exp 7 (V_{PVA}=15ml, T_{sonic}=40s); d) Exp 8 (V_{PVA}=15ml, T_{sonic}=95s);

Observando a figura 4.3, verifica-se que as partículas para a Exp 5 (Fotografia a) não têm qualquer forma apresentando-se aglomeradas, para a Exp 6 (Fotografia b) têm uma forma indefinida com a superfície lisa, encontrando-se as partículas muito aglomeradas, para a Exp 7 (Fotografia c) têm uma forma esférica com a superfície lisa, no entanto algumas têm um aspecto irregular e não se encontram completamente dispersas e para a Exp 8 (Fotografia d) têm uma forma esférica com a superfície lisa, não têm um aspecto uniforme nem homogêneo e não se encontram dispersas. As esferas apresentam um tamanho que varia entre 100 nm e 800 nm para a Exp 6 e entre 100nm e 300 nm para as Exp 7 e 8, de acordo com as medições efectuadas manualmente a partir das fotografias obtidas e ilustradas na distribuição de tamanhos representados na figura 4.4.

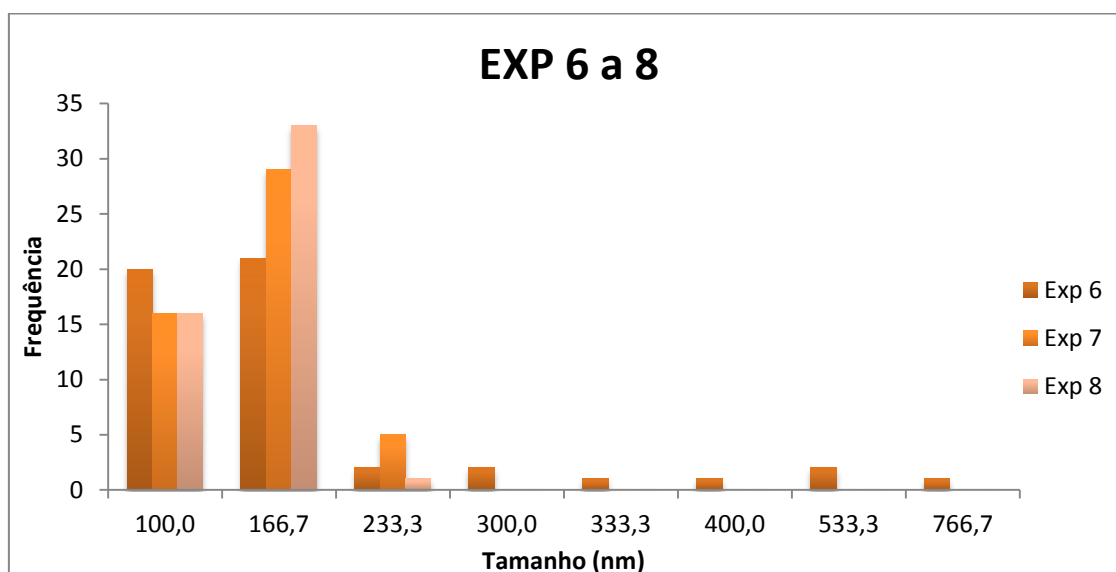


Figura 4.4 Distribuição de tamanho de esferas para as experiências 6, 7 e 8;

4.1.1.3 Experiência 9 a 12

Esferas de PLGA com o fármaco Doxorubicina, nas condições seguintes:

	% PVA (P/V)	V _{PVA} (ml)	T _{sonicação} (s)
Exp 9	0,28	11,00	67,50
Exp 10	4,32	11,00	67,50
Exp 11	2,30	4,27	67,50
Exp 12	2,30	17,70	67,50

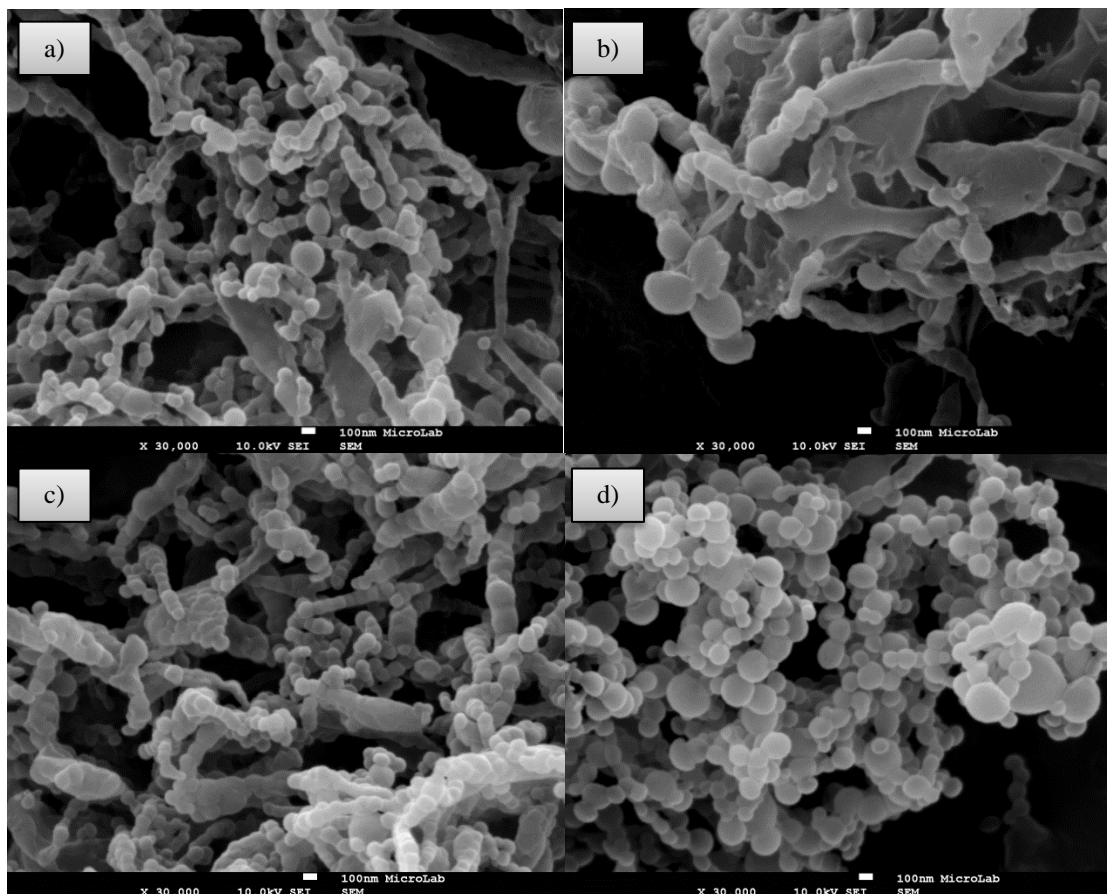


Figura 4.5 Fotografia (SEM) das Nanoesferas de PLGA com Doxorubicina obtidas para: a) Exp 9 (0,28% PVA, $V_{PVA}=11\text{ml}$, $T_{sonic}=67,5\text{s}$); b) Exp 10 (4,32% PVA, $V_{PVA}=11\text{ml}$, $T_{sonic}=67,5\text{s}$); e para 2,30% PVA: c) Exp 11 ($V_{PVA}=4,27\text{ml}$, $t_{sonic}=67,5\text{s}$); d) Exp 12 ($V_{PVA}=17,7\text{ml}$, $T_{sonic}=67,5\text{s}$);

Observando a figura 4.5, verifica-se que as partículas obtidas para as Exp. 9 e 11 (fotografias a e c) têm uma forma esférica com a superfície lisa, não têm um aspecto uniforme nem homogêneo e apresentam algum grau de aglomeração, para a Exp 10 (fotografia b) as partículas têm uma forma indefinida com a superfície lisa, encontrando-se as partículas muito aglomeradas, para a Exp 12 (fotografia d) têm uma forma esférica com a superfície lisa de aspecto uniforme, homogêneo e dispersas. As esferas apresentam um tamanho que varia entre 60 nm e 350 nm, de acordo com as medições efectuadas manualmente a partir das fotografias obtidas, ilustradas na distribuição de tamanhos apresentados na figura 4.6.

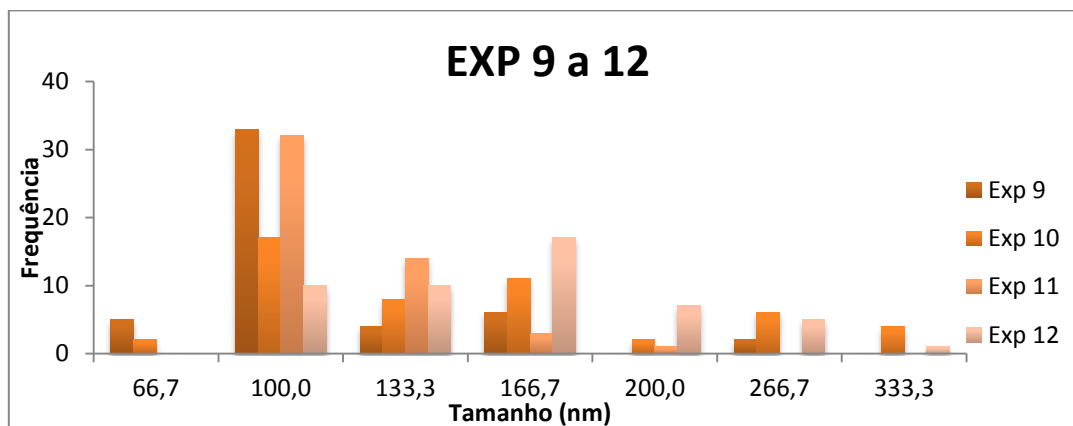


Figura 4.6 Distribuição de tamanho de esferas para as experiências 9, 10, 11 e 12;

4.1.1.4 Experiência 13 a 16

Esferas de PLGA com o fármaco Doxorubicina, nas condições seguintes:

	% PVA (P/V)	V _{PVA} (ml)	T _{sonicação} (s)
Exp 13	2,30	11,00	21,20
Exp 14	2,30	11,00	113,70
Exp 15	2,30	11,00	67,50
Exp 16	2,30	11,00	67,50

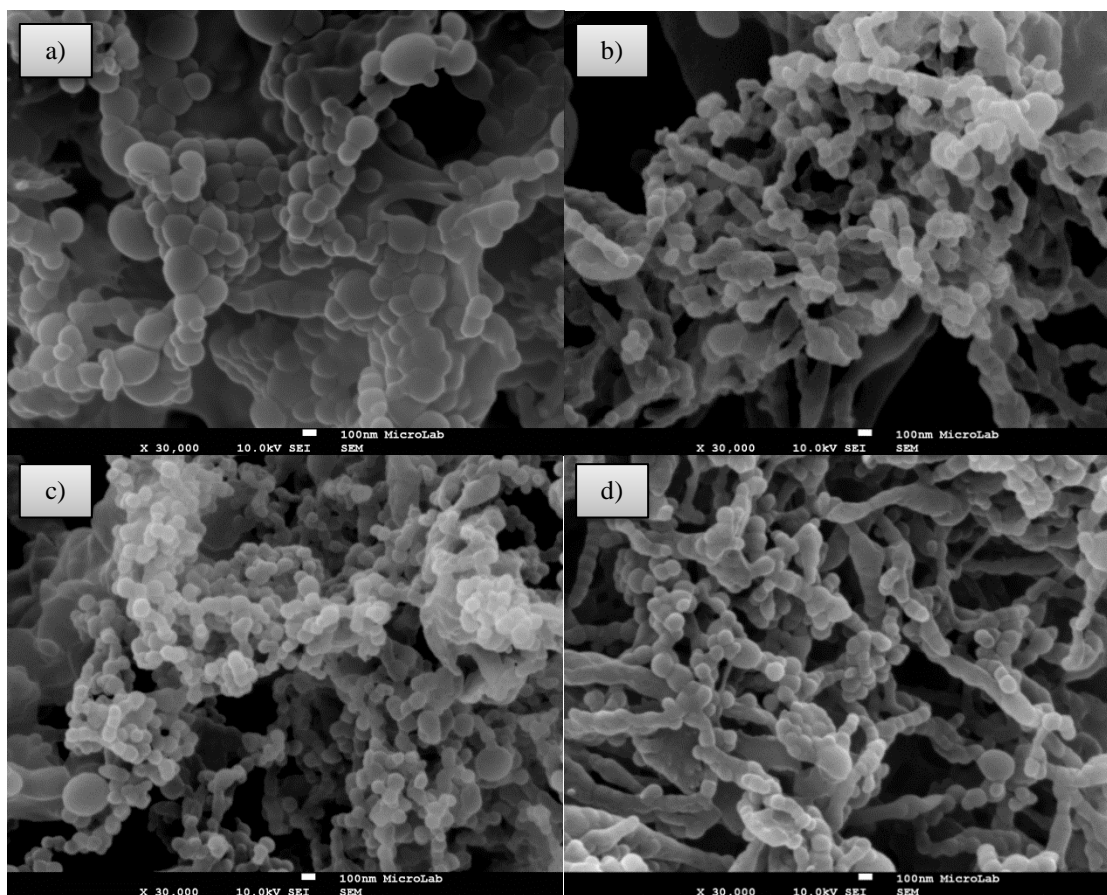


Figura 4.7 Fotografia (SEM) das Nanoesferas de PLGA com Doxorubicina obtidas para 2,3% PVA e V_{PVA}=11ml: a) Exp 13 (T_{sonic}=21,3s); b) Exp 14 (T_{sonic}=113,7s); c) Exp 15 (T_{sonic}=67,5s); d) Exp 16 (T_{sonic}=67,5s);

Observando a figura 4.7, verifica-se que as partículas para a Exp 13 (fotografia a) têm uma forma esférica com a superfície lisa, não têm um aspecto uniforme nem homogêneo e encontram-se aglomeradas, para as Exp 14 e 16 (fotografias b e d) têm uma forma esférica com a superfície lisa, não têm um aspecto uniforme nem homogêneo e não se encontram dispersas e para a Exp 15 (fotografia c) têm uma forma esférica com a superfície lisa de aspecto uniforme, homogêneo e dispersas. As esferas apresentam um tamanho que varia entre 100 nm e 350 nm, de acordo com as medições efectuadas manualmente a partir das fotografias obtidas, ilustradas na distribuição de tamanhos apresentados na figura 4.8.

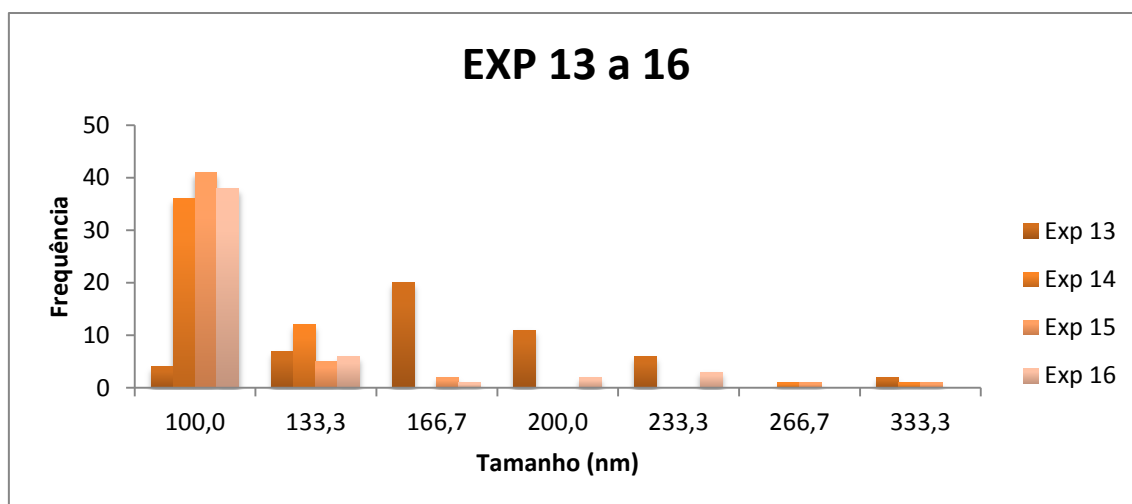


Figura 4.8 Distribuição de tamanho de esferas para as experiências 13, 14, 15 e 16;

A tabela 4.1 apresenta os intervalos e os valores médios de tamanho das nanoesferas obtidos pelas medições efectuadas manualmente pela observação das fotos obtidas pelo SEM.

Tabela 4.1 Intervalos e valores médios de tamanhos das nanopartículas;

	<i>Intervalo de tamanhos (nm)</i>	<i>Tamanho médio (nm)</i>
Exp 1	100 – 470	200
Exp 2	150 – 300	167
Exp 3	100 – 470	183
Exp 4	100 – 300	167
Exp 5	0 – 0	0
Exp 6	100 – 770	133
Exp 7	100 – 240	133
Exp 8	100 – 240	133
Exp 9	60 – 170	100
Exp 10	60 – 340	133
Exp 11	100 – 200	100
Exp 12	100 – 340	167
Exp 13	100 – 340	167
Exp 14	100 – 340	100
Exp 15	100 – 340	100
Exp 16	100 – 240	100

4.1.2 Caracterização do Tamanho e Potencial Zeta das nanoesferas por Dispersão Dinâmica de luz (DLS)

Os valores do tamanho e do potencial zeta obtidos por DLS para as nanoesferas produzidas estão apresentados na tabela 4.2.

Tabela 4.2 Tamanho e Potencial Zeta obtidos por DLS;

	Tamanho DLS (nm)	Potencial Zeta (mV)
Exp 1	327,9	-6,07
Exp 2	840,6	-5,72
Exp 3	497,1	-6,20
Exp 4	332,7	-3,06
Exp 5	215,2	-5,41
Exp 6	322,2	-6,76
Exp 7	1289,9	-5,30
Exp 8	352,0	-4,73
Exp 9	323,7	-4,91
Exp 10	412,3	-6,75
Exp 11	426,3	-16,98
Exp 12	315,5	-5,68
Exp 13	853,1	-6,28
Exp 14	307,1	-6,62
Exp 15	424,0	-9,96
Exp 16	301,7	-9,96

O potencial zeta mede o potencial na dupla camada eléctrica que rodeia uma partícula carregada. A magnitude do seu valor dá uma indicação da estabilidade do sistema coloidal. Quando o seu valor absoluto é elevado as partículas têm tendência a repelir-se, enquanto que para valores absolutos baixos poderão agregar-se. Assim, em geral suspensões coloidais estáveis apresentam um potencial zeta próximo de 30 mV (podendo ser um valor positivo ou negativo).

Nas experiências 4, 8 e 9 os valores do potencial zeta medido variam entre 0 e 5 mV, o que pode indicar que as nanopartículas poderão apresentar alguma tendência para sofrerem agregação. De facto, esta tendência de aglomeração está de acordo com os resultados obtidos por microscopia (SEM).

Na experiência 11 o valor do potencial zeta obtido foi de -16,98 mV, o valor mais elevado. O que indica uma maior estabilidade das partículas.

Nas restantes experiências as nanopartículas apresentaram um potencial zeta entre 5 e 10 mV, o que pode indicar alguma instabilidade coloidal e tendência para aglomeração.

Comparando os valores dos tamanhos obtidos pela medição efectuada a partir da análise das imagens de SEM com os valores obtidos por DLS, conclui-se que os valores obtidos por DLS

são muito superiores aos obtidos a partir do SEM. O que confirma a agregação das partículas em solução aquosa.

Assim, os valores de DLS obtidos referem-se ao tamanho de agregados e não ao tamanho das partículas individuais. Por este facto optou-se por considerar como tamanho das partículas os valores medidos por análise das fotografias obtidas por microscopia.

4.1.3 Calorimetria de Varrimento de Diferencial (DSC)

Foram caracterizadas as propriedades cristalinas do polímero utilizado na produção das nanopartículas, PLGA, por calorimetria de varrimento diferencial (DSC), apresentando-se abaixo o termograma correspondente.

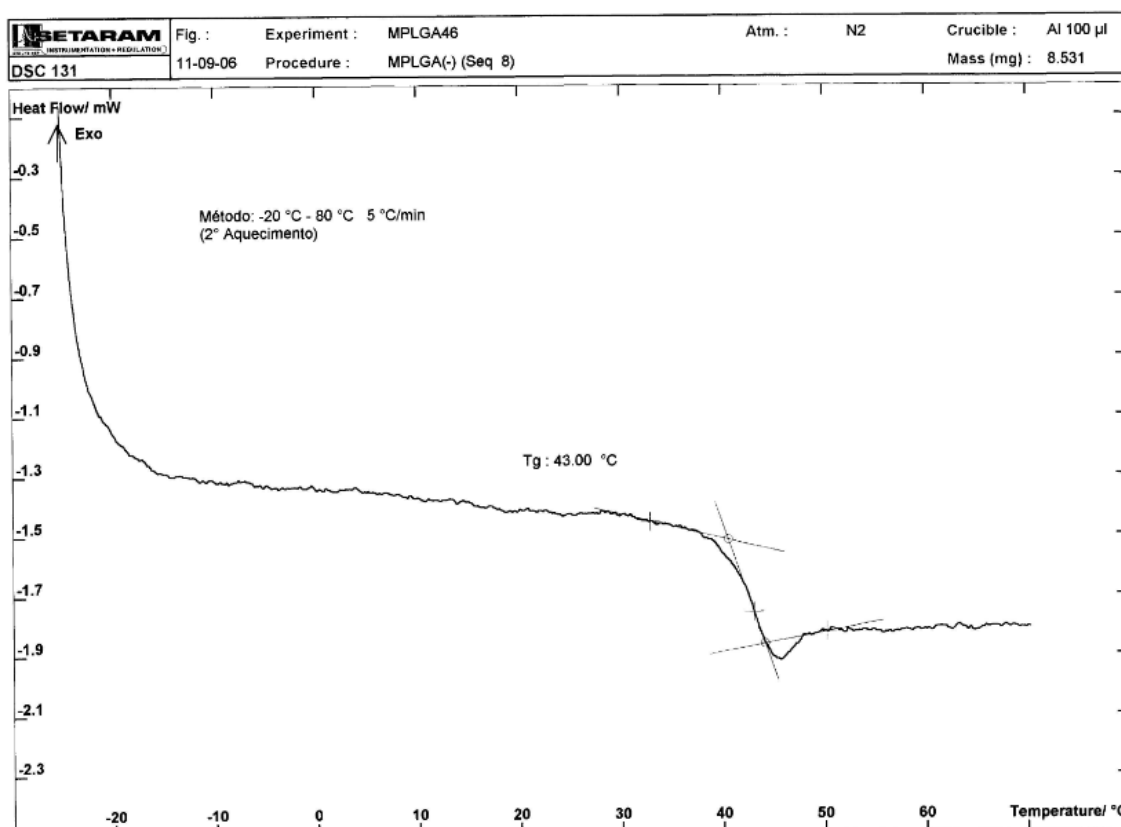


Figura 4.9 Termograma obtido por calorimetria de varrimento diferencial (DSC) para o PLGA;

Observando o termograma, verifica-se que a temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero, PLGA, é de 43°C, valor característico do PLGA. Este valor representa a temperatura a partir da qual o polímero passa de um estado amorfo e quebradiço, apresentando uma estrutura rígida, para um estado maleável.

Como os ensaios de libertação são realizadas a 37°C, o polímero encontra-se no estado amorfo. No entanto, dada a proximidade com a T_g , as suas cadeias deverão apresentar já alguma flexibilidade, o que facilitará a velocidade de libertação da Doxorubicina.

4.1.4 Resultado das Variáveis dependentes para cada experiência

Na tabela 4.3 são apresentados os valores obtidos para as variáveis dependentes em todas as experiências realizadas.

Tabela 4.3 Variáveis dependentes obtidas nas experiências: Tamanho, potencial zeta, carregamento de fármaco e rendimento.

	Tamanho médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	Carregamento de fármaco (%p/p)	Rendimento (%p/p)
<i>Exp 1</i>	200	-6,07	5,38%	62,32%
<i>Exp 2</i>	167	-5,72	4,06%	65,45%
<i>Exp 3</i>	183	-6,20	3,95%	50,62%
<i>Exp 4</i>	167	-3,06	4,07%	43,60%
<i>Exp 5</i>	0,0	-5,41	26,27%	28,33%
<i>Exp 6</i>	133	-6,76	80,54%	26,69%
<i>Exp 7</i>	133	-5,30	5,64%	45,27%
<i>Exp 8</i>	133	-4,73	5,18%	43,48%
<i>Exp 9</i>	100	-4,91	28,46%	28,35%
<i>Exp 10</i>	133	-6,75	12,14%	35,59%
<i>Exp 11</i>	100	-16,98	29,58%	29,80%
<i>Exp 12</i>	167	-5,68	6,02%	42,02%
<i>Exp 13</i>	167	-6,28	4,52%	68,85%
<i>Exp 14</i>	100	-6,62	20,79%	29,12%
<i>Exp 15</i>	100	-9,96	23,91%	33,12%
<i>Exp 16</i>	100	-9,96	22,12%	34,64%

4.2 Optimização das condições experimentais no Statistica

A optimização das condições experimentais na preparação das nanoesferas de PLGA foi feita no programa estatística STATISTICA 8 da StatSoft, utilizando-se o Desenho & Análise de experiências usando o método do Composto Central.

As variáveis independentes (condições experimentais) são a % PVA (P/V), V_{PVA} (ml) e o T_{son} (s).

4.2.1 Desenho de Experiências no Statistica

Para poder aplicar o Desenho de Experiências usando o método do Composto Central, escolheram-se os limites superior e inferior das condições experimentais em estudo. Estes foram seleccionados com base em estudos preliminares e estão apresentados na tabela 3.1 na seção 3.2.1.1.

O Desenho de Experiências realizou-se no Statistica 8, onde foram seguidos alguns passos para a sua execução.

No programa, clica-se em *Statistics* e em seguida sequencialmente *Industrial Statistica & Six Sigma*; *Experimental Design (DOE)*; *Central Composite, non-factorial, Surface Design*. Posteriormente, escolheu-se no separador *Design Experimental* um Design com 3 factores, 1 bloco e 16 runs (3/1/16), tendo-se em seguida introduzido os valores dos factores (estando estes inicialmente na forma padrão) [10]. O programa Statistica constrói assim uma tabela com as variáveis independentes a usar nas várias experiências (tabela 3.2 apresentada na seção 3.2.1.1).

4.2.2 Análise do Desenho de experiências no Statistica

A análise do Desenho realizou-se no Statistica 8, onde foram seguidos alguns passos para a sua execução.

No programa adicionam-se os valores apresentados na tabela 3.2, como variáveis dependentes, para que a partir destas seja feita a análise dos dados. Clica-se em *Statistics* e de forma sequencial em *Industrial Statistica & Six Sigma*; *Experimental Design (DOE)*; *Central Composite, non-factorial e Surface Design*. Posteriormente, escolheu-se no separador *Analyse Design*, clicou-se em *Variables* e seleccionou-se em variáveis dependentes, tamanho, potencial zeta, carregamento de fármaco e o Rendimento, e em variáveis independentes, %PVA, V_{PVA} e $T_{sonicação}$. Seguidamente pressionou-se o *OK*, no separador *Quick*, clicou-se em *Anova Table*, e em *Predicted (estimated) Response* clicou-se em *fitted response surface*. [10] Obteve-se assim inicialmente, a tabela Anova e de seguida os gráficos de superfície, onde nestes se faz a análise das melhores condições experimentais.

Efectuou-se para cada variável dependente a análise em relação às variáveis independentes.

4.2.2.1 Variável dependente: Tamanho das Nanoesferas

Para se efectuar a análise da variável dependente, tamanho, foi necessário construir a tabela ANOVA, tabela 4.4. Nesta verificamos qual a variável que tem menor probabilidade de estar fora dos limites (neste caso, menor que $p=0,25$), e desprezam-se as restantes, obtendo-se a Tabela ANOVA condensada, tabela 4.5.

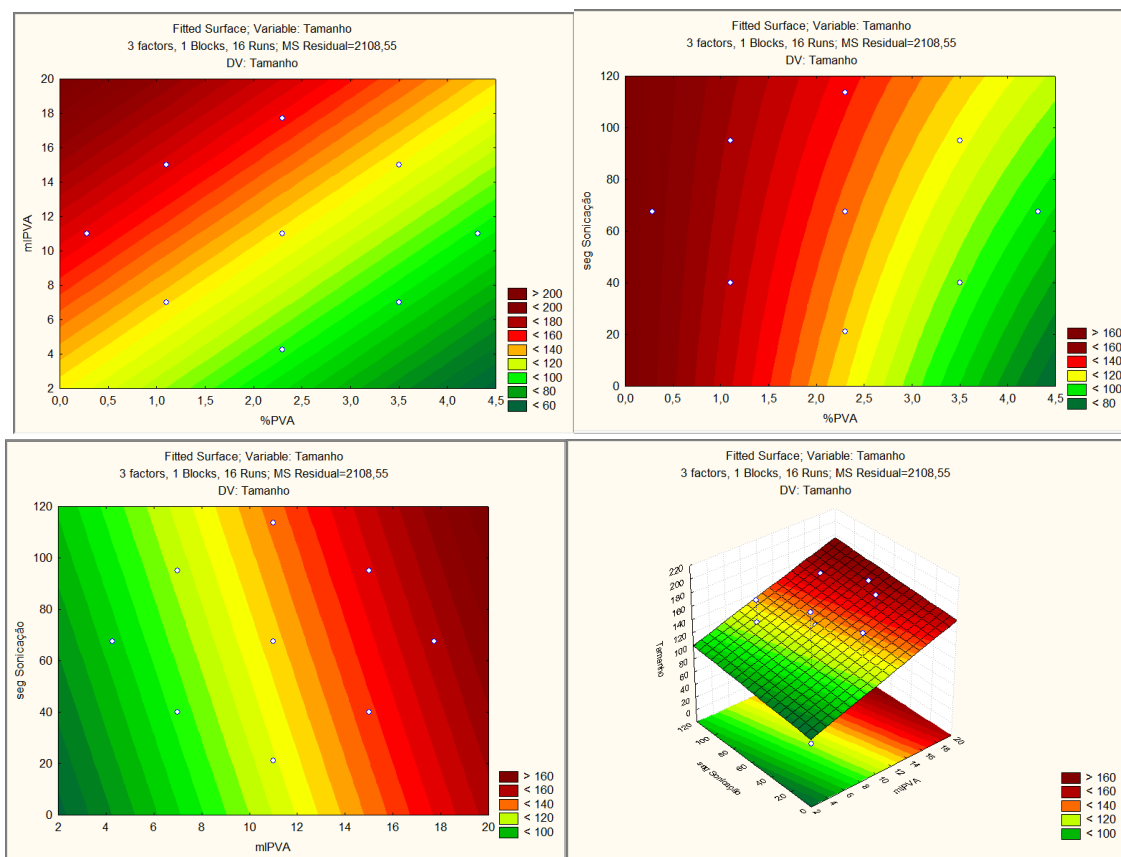
Tabela 4.4 Tabela ANOVA para a variável dependente tamanho

ANOVA; Var.:Tamanho; R-sqr=.5836; Adj:0, (dados.sta) 3 factors, 1 Blocks, 16 Runs; MS Residual=2380,872 DV: Tamanho					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)%PVA(L)	4934,94	1	4934,939	2,072744	0,200014
%PVA(Q)	635,01	1	635,010	0,266713	0,624020
(2)mlPVA (L)	3799,30	1	3799,304	1,595762	0,253372
mlPVA (Q)	1860,59	1	1860,594	0,781476	0,410710
(3)seg Sonicação(L)	64,96	1	64,965	0,027286	0,874223
seg Sonicação(Q)	1860,59	1	1860,594	0,781476	0,410710
1L by 2L	2775,13	1	2775,125	1,165592	0,321785
1L by 3L	4155,68	1	4155,681	1,745445	0,234596
2L by 3L	1672,35	1	1672,347	0,702409	0,434086
Error	14285,23	6	2380,872		
Total SS	34306,49	15			

Tabela 4.5 Tabela ANOVA condensada para a variável dependente tamanho

ANOVA; Var.:Tamanho; R-sqr=.37573; Adj:.21966 (dados.sta) 3 factors, 1 Blocks, 16 Runs; MS Residual=1784,714 DV: Tamanho					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)%PVA(L)	4934,94	1	4934,939	2,765115	0,122217
(2)mlPVA (L)	3799,30	1	3799,304	2,128803	0,170229
1L by 3L	4155,68	1	4155,681	2,328485	0,152941
Error	21416,57	12	1784,714		
Total SS	34306,49	15			

Em seguida, com os resultados obtidos podem ser construídos os gráficos de superfície para a variável dependente tamanho, apresentados na figura 4.10.



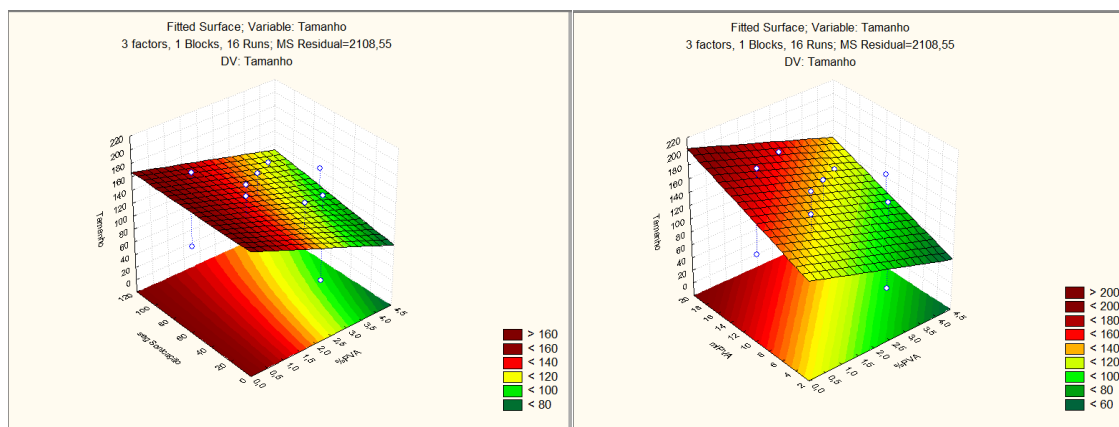


Figura 4.10 Gráficos de superfície, para a variável dependente tamanho. o-valores dos limites para as variáveis independentes.

Nos gráficos de superfície obtidos, podemos observar que menores tamanhos são obtidos com menores volumes de PVA e maiores concentrações de PVA, e que quanto maior o volume de PVA utilizado, maior a concentração de PVA necessária para se obterem nanoesferas de tamanho aproximadamente 100 nm. Quanto ao tempo de sonicação, em geral são obtidos menores tamanhos para tempos menores, no entanto, esta influência é menos evidente do que no caso da concentração e do volume de PVA.

Assim, observando os gráficos de superfície, podemos concluir que se se pretenderem tamanhos de cerca de 100nm, o volume de PVA deverá variar entre os 6 ml e os 10 ml, o tempo de sonicação entre os 40 s e os 80 s e a %PVA entre 2% e 3%.

Estes resultados eram os esperados pois quanto maior a %PVA mais estável é a interface fase aquosa/fase orgânica. Esta estabilidade leva a um menor grau de coalescência da emulsão e a um menor tamanho das partículas formadas. Relativamente ao $T_{\text{sonicação}}$ há a considerar dois efeitos contrários. Por um lado, um maior tempo provocará grande turbulência e assim menores tamanhos. Por outro, uma maior turbulência pode provocar maior instabilidade interfacial contribuindo para a coalescência das gotas da emulsão, o que leva a um aumento do tamanho da nanopartícula. Pelos resultados obtidos, pode verificar-se que com a potência utilizada (2000W) o segundo efeito prevalece sobre o primeiro.

4.2.2.2 Variável dependente: Potencial zeta das Nanoesferas

Para se efectuar a análise da variável dependente, potencial zeta, foi necessário construir a tabela ANOVA, tabela 4.6. Nesta verificamos qual a variável que tem menor probabilidade de estar fora dos limites (neste caso, menor que $p=0,10$), e desprezam-se as restantes, obtendo-se a Tabela ANOVA condensada, tabela 4.7.

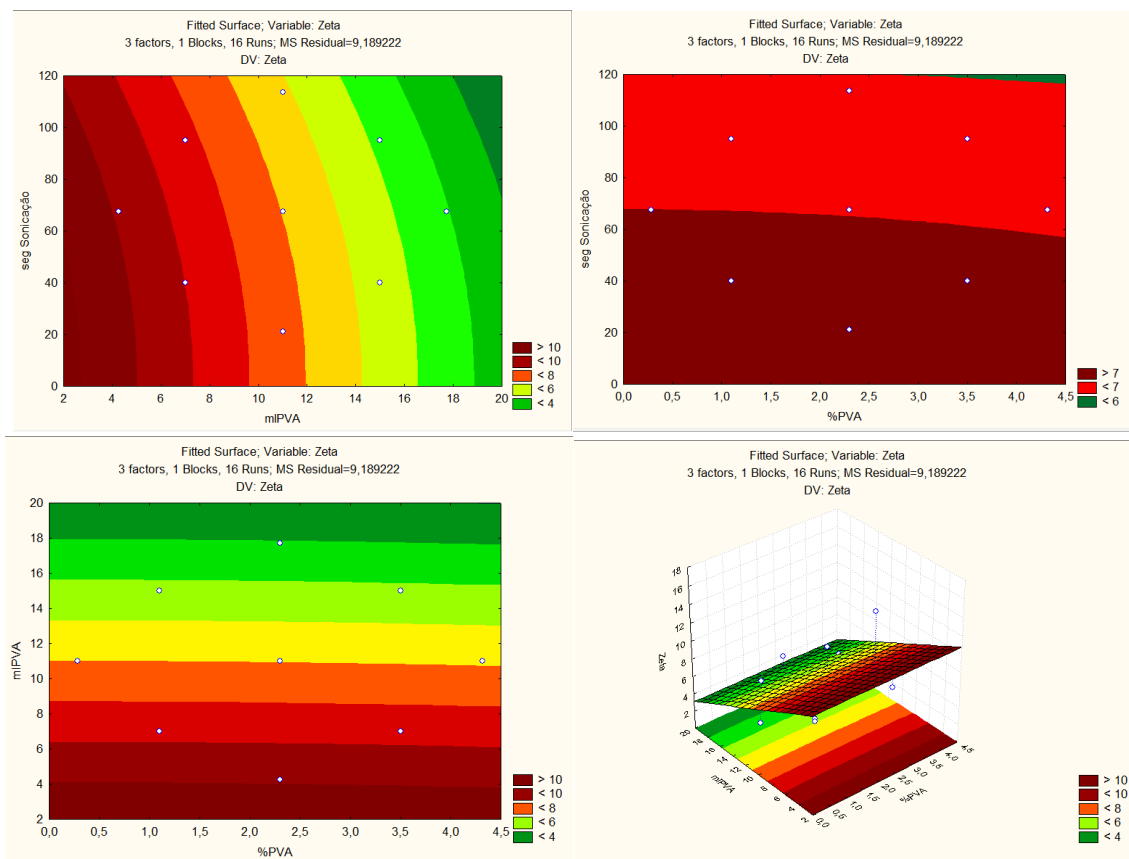
Tabela 4.6 Tabela ANOVA para a variável dependente potencial zeta.

ANOVA; Var.:Zeta; R-sqr=.71142; Adj.:27854 (dados.sta) 3 factors, 1 Blocks, 16 Runs; MS Residual=7,368188 DV: Zeta					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)%PVA(L)	1,3214	1	1,32137	0,179334	0,686707
%PVA(Q)	37,2349	1	37,23494	5,053473	0,065622
(2)mlPVA (L)	41,0728	1	41,07284	5,574347	0,056207
mlPVA (Q)	0,0329	1	0,03294	0,004470	0,948867
(3)seg Sonicação(L)	0,3359	1	0,33587	0,045584	0,838004
seg Sonicação(Q)	29,5376	1	29,53765	4,008807	0,092145
1L by 2L	0,0194	1	0,01936	0,002627	0,960785
1L by 3L	2,2829	1	2,28288	0,309829	0,597917
2L by 3L	2,7772	1	2,77716	0,376913	0,561799
Error	44,2091	6	7,36819		
Total SS	153,1930	15			

Tabela 4.7 Tabela ANOVA condensada para a variável dependente potencial zeta.

ANOVA; Var.:Zeta; R-sqr=.66723; Adj.:58403 (dados.sta) 3 factors, 1 Blocks, 16 Runs; MS Residual=4,248225 DV: Zeta					
Factor	SS	df	MS	F	p
%PVA(Q)	44,1296	1	44,12963	10,38778	0,007314
(2)mlPVA (L)	41,0728	1	41,07284	9,66823	0,009031
seg Sonicação(Q)	34,8982	1	34,89815	8,21476	0,014191
Error	50,9787	12	4,24822		
Total SS	153,1930	15			

Em seguida, com os resultados obtidos podem ser construídos os gráficos de superfície para a variável dependente potencial zeta, apresentadas na figura 4.11.



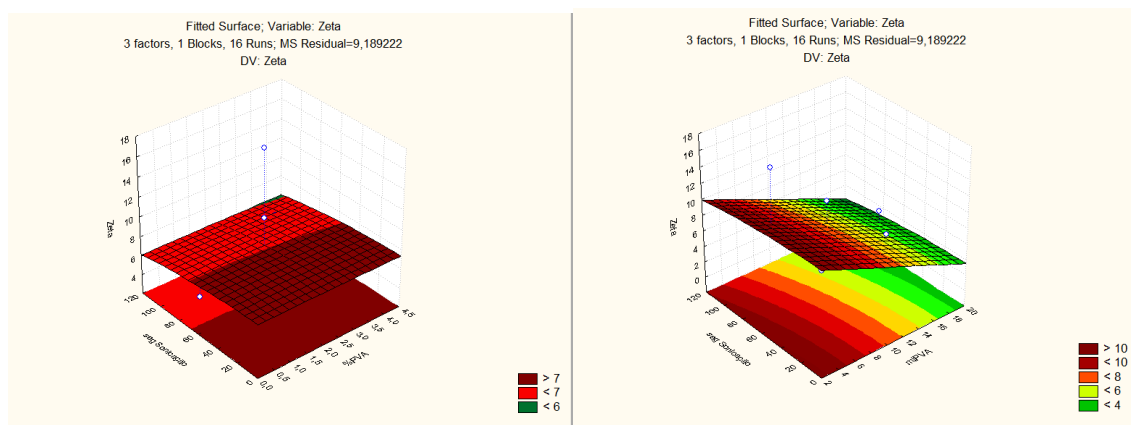


Figura 4.11 Gráficos de superfície, para a variável dependente potencial zeta. o-valores dos limites para as variáveis independentes.

Nos gráficos de superfície obtidos pode-se observar que a %PVA não afecta e o tempo de sonicação afecta pouco o potencial zeta. O volume de PVA mostra grande influência sobre esta variável dependente, obtendo-se um maior potencial zeta para valores de volume de PVA baixos.

As condições que permitem uma maximização do potencial zeta, e assim uma maximização da estabilidade das partículas produzidas, são um $T_{sonicação}$ inferior a 60s e um volume de PVA inferior a 4ml.

4.2.2.3 Variável dependente: carregamento de fármaco

Para se efectuar a análise da variável dependente, carregamento de fármaco, foi necessário construir a tabela ANOVA, tabela 4.8. Nesta verificamos qual a variável que tem menor probabilidade de estar fora dos limites (neste caso, menor que $p=0,10$), e desprezam-se as restantes, obtendo-se a Tabela ANOVA condensada, tabela 4.9.

Tabela 4.8 Tabela ANOVA para a variável dependente carregamento de fármaco.

ANOVA; Var.:%incorp; R-sqr=,73781; Adj.,34452 (dados.sta)					
3 factors, 1 Blocks, 16 Runs; MS Residual=249,1951					
DV: %incorp					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)%PVA(L)	387,235	1	387,235	1,553945	0,259013
%PVA(Q)	7,227	1	7,227	0,029003	0,870371
(2)mlPVA (L)	1375,037	1	1375,037	5,517913	0,057135
mlPVA (Q)	28,881	1	28,881	0,115896	0,745132
(3)seg Sonicação(L)	468,089	1	468,089	1,878404	0,219577
seg Sonicação(Q)	119,075	1	119,075	0,477840	0,515243
1L by 2L	1117,949	1	1117,949	4,486242	0,078492
1L by 3L	378,183	1	378,183	1,517618	0,264066
2L by 3L	355,041	1	355,041	1,424750	0,277672
Error	1495,170	6	249,195		
Total SS	5702,602	15			

Tabela 4.9 Tabela ANOVA condensada para a variável dependente carregamento de fármaco.

ANOVA; Var.:%incorp; R-sqr=.43/1/; Adj.:.35058 (dados.sta)					
3 factors, 1 Blocks, 16 Runs; MS Residual=246,8936					
DV: %incorp					
Factor	SS	df	MS	F	p
(2)mlPVA (L)	1375,037	1	1375,037	5,569350	0,034579
1L by 2L	1117,949	1	1117,949	4,528062	0,053050
Error	3209,616	13	246,894		
Total SS	5702,602	15			

Em seguida, com os resultados obtidos podem ser construídos os gráficos de superfície para a variável dependente carregamento de fármaco, apresentadas na figura 4.12.

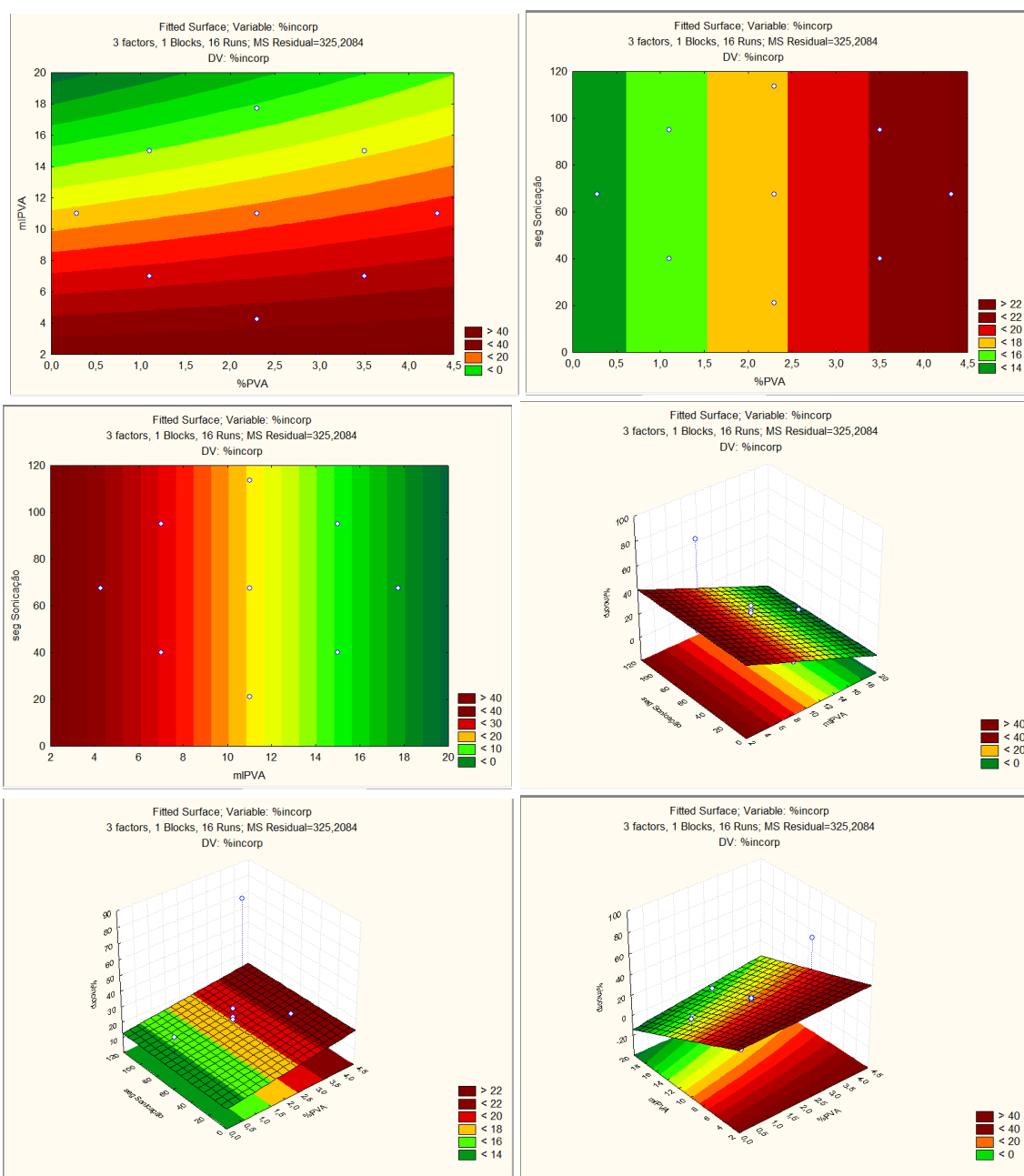


Figura 4.12 Gráficos de superfície, para a variável dependente, carregamento de fármaco. o-valores dos limites para as variáveis independentes.

Apos observação dos gráficos de superfície, podemos concluir que o carregamento de fármaco é independente do tempo de sonicação e apresenta uma grande dependência da %PVA e do volume de PVA. São obtidos maiores valores de carregamento ($> 40\%$) para baixos volumes de PVA e para elevadas %PVA. Para maximizar o carregamento, a %PVA deve ser superior a 3,5% (p/v) e o volume de PVA deve ser inferior a 4ml.

4.2.2.4 Variável dependente: Rendimento

Para se efectuar a análise da variável dependente, rendimento, foi necessário construir a tabela ANOVA, tabela 4.10. Nesta verificamos qual a variável que tem menor probabilidade de estar fora dos limites (neste caso, menor que $p=0,20$), e desprezam-se as restantes, obtendo-se a Tabela ANOVA condensada, tabela 4.11.

Tabela 4.10 Tabela ANOVA para a variável dependente rendimento.

ANOVA; Var.: %Rend; R-sqr=,6324; Adj.:08099 (dados.sta) 3 factors, 1 Blocks, 16 Runs; MS Residual=175,761 DV: %Rend					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)%PVA(L)	319,443	1	319,4433	1,817487	0,226279
%PVA(Q)	6,375	1	6,3751	0,036272	0,855236
(2)mlPVA (L)	31,492	1	31,4915	0,179173	0,686838
mlPVA (Q)	45,779	1	45,7791	0,260462	0,628029
(3)seg Sonicação(L)	402,521	1	402,5214	2,290164	0,180962
seg Sonicação(Q)	434,068	1	434,0682	2,469651	0,167122
1L by 2L	565,905	1	565,9053	3,219744	0,122908
1L by 3L	0,024	1	0,0237	0,000135	0,991107
2L by 3L	13,288	1	13,2880	0,075603	0,792570
Error	1054,566	6	175,7610		
Total SS	2868,758	15			

Tabela 4.11 Tabela ANOVA condensada para a variável dependente rendimento.

ANOVA; Var.: %Rend; R-sqr=,48942; Adj.:36178 (dados.sta) 3 factors, 1 Blocks, 16 Runs; MS Residual=122,0599 DV: %Rend					
Factor	SS	df	MS	F	p
(3)seg Sonicação(L)	402,521	1	402,5214	3,297737	0,094426
seg Sonicação(Q)	435,612	1	435,6124	3,568841	0,083274
1L by 2L	565,905	1	565,9053	4,636292	0,052343
Error	1464,719	12	122,0599		
Total SS	2868,758	15			

Em seguida, com os resultados obtidos podem ser construídos os gráficos de superfície para a variável dependente rendimento, apresentadas na figura 4.13.

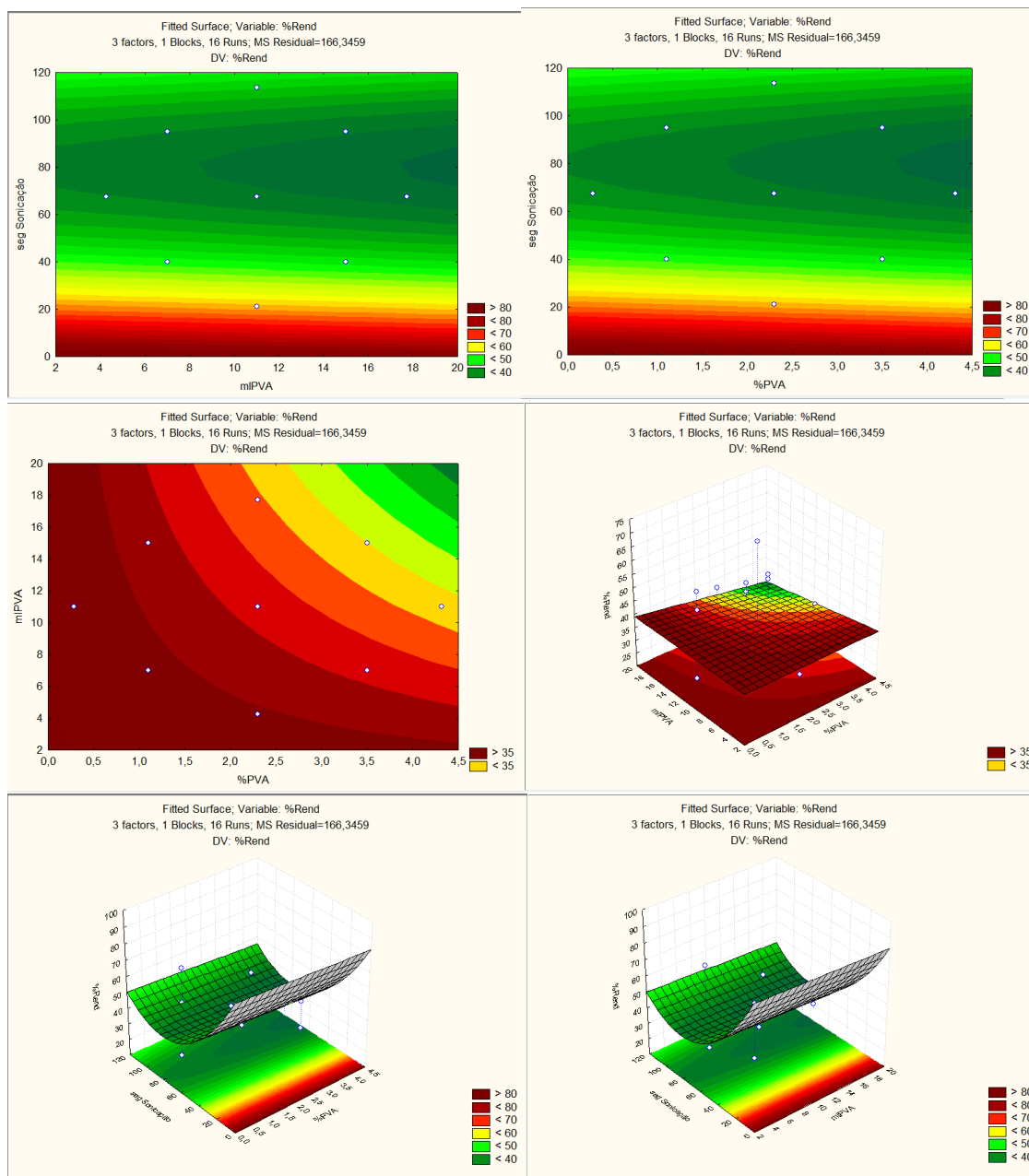


Figura 4.13 Gráficos de superfície, para a variável dependente rendimento. o-valores dos limites para as variáveis independentes.

Nos gráficos obtidos pode se observar que o rendimento diminui com o aumento do $T_{sonicação}$. Um elevado $T_{sonicação}$ provoca uma maior turbulência o que facilita a perda de polímero e de fármaco para a fase aquosa levando a uma diminuição do rendimento obtido.

Relativamente ao efeito da %PVA e V_{PVA} verifica-se que para %PVA abaixo de 1%, o rendimento é independente do V_{PVA} utilizado e apresenta um valor de rendimento superior a 35%. No entanto, para %PVA superiores, verifica-se que o aumento da %PVA e do V_{PVA} provocam uma diminuição do rendimento.

Assim, para se obter um rendimento máximo, podemos concluir que se pode utilizar uma %PVA elevada com um V_{PVA} baixo, ou uma %PVA baixa com qualquer V_{PVA} . O $T_{sonicação}$ deve ser sempre inferior a 20 segundos.

4.3 Caracterização das partículas optimizadas

Após a análise dos gráficos obtidos pelo Statistica, foi possível seleccionar as condições experimentais a utilizar na produção de dois tipos de partículas com diferentes tamanhos, esfera tipo A com tamanho entre 120-140nm, e esfera tipo B com tamanho entre 100-120nm. Efectuou-se uma réplica para cada uma das esferas seleccionadas, para se ter em conta os possíveis erros.

Assim, os valores das variáveis independentes, seleccionados são:

Tabela 4.12 Valor das variáveis independentes.

Variáveis Independentes	%PVA (P/V)	V _{PVA} (ml)	T _{sonicação} (s)
Esfera A	3%	15	60
Esfera B	3%	4	60

A que correspondem, de acordo com os gráficos de superfície obtidos, os valores para as variáveis dependentes:

Tabela 4.13 Valor esperado para as variáveis dependentes.

Variáveis dependentes	Tamanho (nm)	Potencial zeta (-mV)	Carregamento de fármaco (%)	Rendimento (%)
Esfera A	120-140	6-7	10-20	35-40
Esfera B	100-120	7-10	20-40	35-45

4.3.1 Caracterização morfológica das nanoesferas

As fotografias das esferas tipo A e tipo B de PLGA com Doxorubicina e a sua respectiva réplica, obtidas por microscopia estão representadas nas figuras 4.14 e 4.16.

4.3.1.1 Esferas tipo A

Esferas tipo A de PLGA com Doxorubicina, estão representadas na figura 4.14.

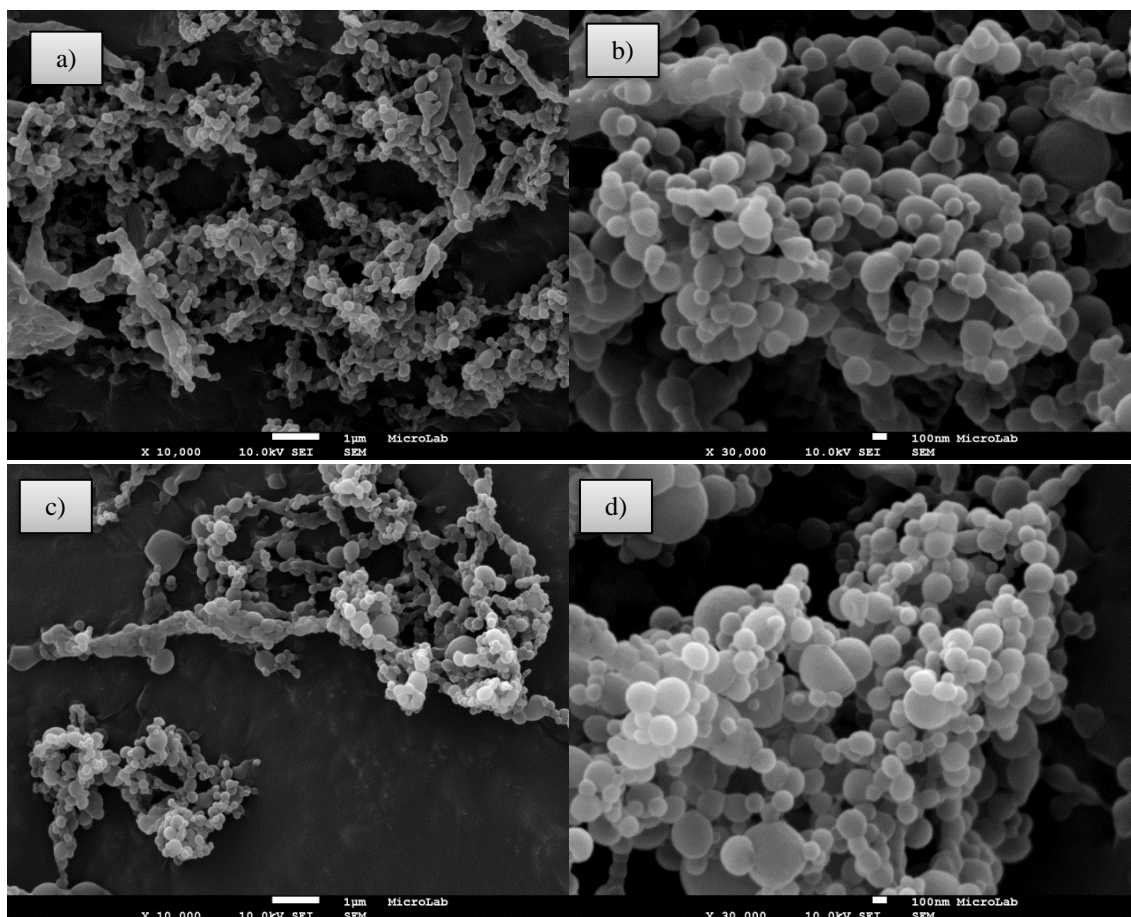


Figura 4.14 Fotografias das Nanoesferas de PLGA com Doxorubicina obtidas por SEM com uma ampliação a)x10,000 e b)x30,000, para as esferas do tipo A; e c)x10,000 e d)x30,000, para a réplica das esferas do tipo A;

Observando a figura 4.14, verifica-se que as partículas obtidas têm uma forma esférica com uma superfície lisa. No entanto, o seu aspecto não é uniforme e homogêneo e algumas esferas apresentam-se pouco dispersas. As esferas apresentam um tamanho que varia entre os 75 nm e 250 nm, de acordo com as medições efectuadas com base nas fotografias do SEM, ilustradas no gráfico de distribuição de tamanhos apresentados na figura 4.15.

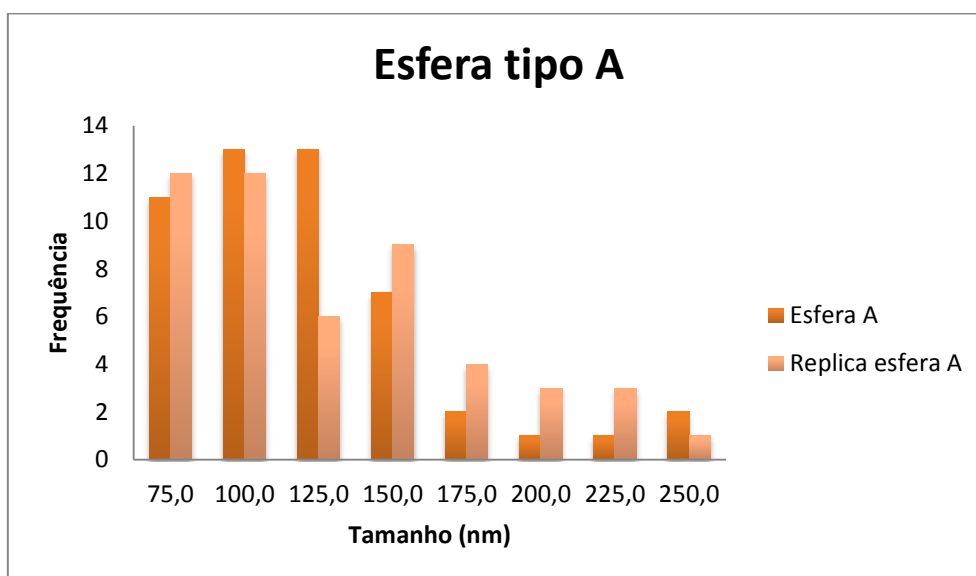


Figura 4.15 Distribuição de tamanhos das esferas tipo A;

4.3.1.2 Esferas tipo B

Esferas tipo B de PLGA com Doxorubicina, estão representadas na figura 4.17.

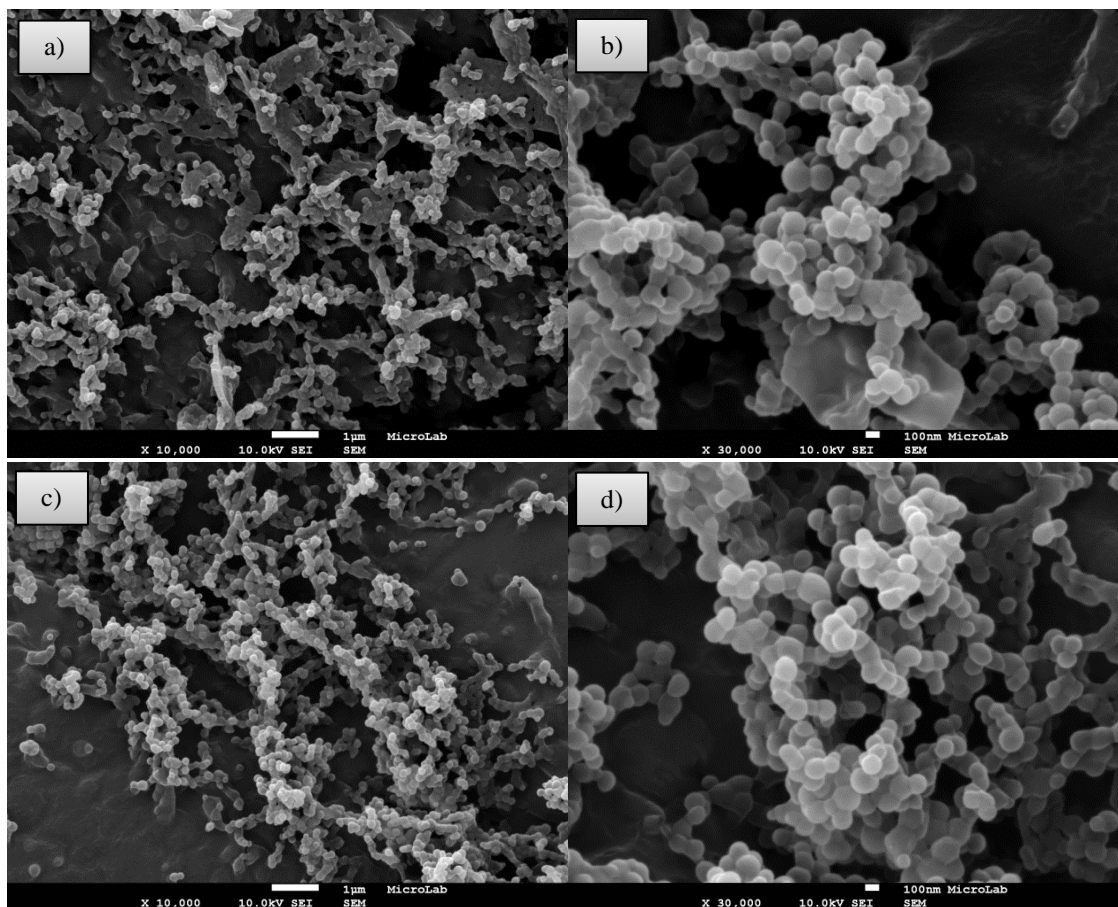


Figura 4.16 Fotografias das Nanoesferas de PLGA com Doxorubicina obtidas por SEM com uma ampliação a) x10,000 e b) x30,000, para as esferas do tipo B; e c) x10,000 e d) x30,000, para a réplica das esferas do tipo B;

Observando a figura 4.16, verifica-se que as partículas obtidas têm uma forma esférica com a superfície lisa de aspecto uniforme, homogêneo e dispersas. As esferas apresentam um tamanho que varia entre os 75 nm e 200 nm, de acordo com as medições efectuadas com base nas fotografias do SEM, ilustradas no gráfico de distribuição de tamanhos apresentados na figura 4.17.

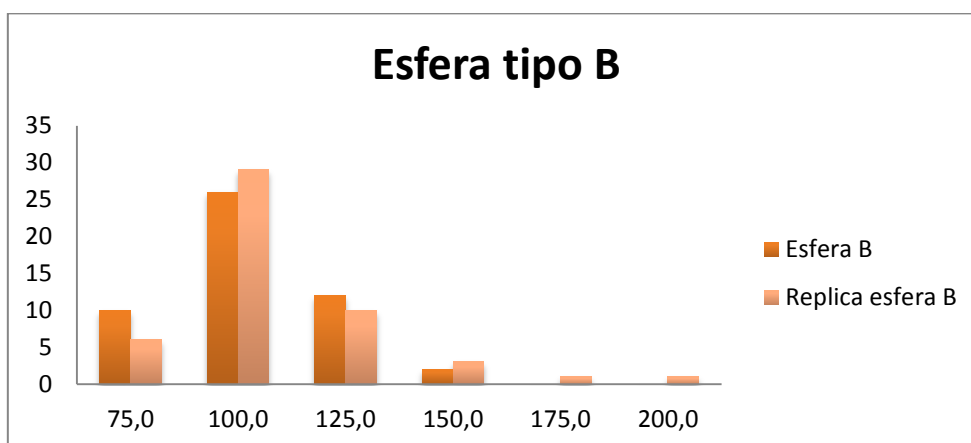


Figura 4.17 Distribuição de tamanhos das esferas tipo B;

4.3.2 Resultado das Variáveis dependentes para as esferas A e B

Na tabela 4.14 está o resumo dos valores obtidos das variáveis dependentes para cada tipo de esfera.

Tabela 4.14 Resultado das variáveis dependentes para cada tipo de esfera.

	<i>Tamanho médio (nm)</i>	<i>Tamanho por DLS (nm)</i>	<i>Potencial Zeta (mV)</i>	<i>Carregamento de fármaco (%)</i>	<i>Rendimento (%)</i>
Esfera A	125	359,6	-11,3	10,23%	53,78%
Réplica A	125	-	-	12,58%	59,02%
Esfera B	100	390,7	-9,47	21,52%	26,11%
Réplica B	100	-	-	19,44%	26,28%

Comparando os valores obtidos para as variáveis dependentes com os valores esperados, apresentados na tabela 4.13, concluímos que:

- O tamanho encontra-se no intervalo esperado;
- O Potencial Zeta obtido é mais elevado do que o previsto, o que representa uma vantagem já que maior valor de potencial zeta corresponde maior estabilidade das nanoesferas;
- A percentagem de incorporação obtida também se encontra no intervalo esperado;
- O rendimento obtido para as esferas do tipo A é superior e para as esferas do tipo B é inferior ao esperado;

Numa avaliação geral, os valores previstos do tamanho das nanopartículas e a percentagem de carregamento de fármaco estão no intervalo esperado.

4.4 Ensaios de libertação

Realizaram-se ensaios de libertação para cada tipo de esfera e para a sua respectiva réplica, com o objectivo de obter os perfis de libertação da Doxorubicina.

Os ensaios de libertação realizaram-se com 7ml de Tampão PBS com um pH de 7,4, uma temperatura de 37°C e uma agitação de 120rpm (de acordo com o descrito em 3.2.3)

4.4.1 Ensaios de libertação – Esfera tipo A

Nos ensaios de libertação da Doxorubicina utilizaram-se 7,95mg de nanoesferas tipo A e 8,18mg na sua réplica. A partir das medições da concentração de Doxorubicina efectuadas ao longo de tempo, calculou-se a percentagem de Doxorubicina libertada, utilizando a equação 8 (descrita na secção 3.2.3)

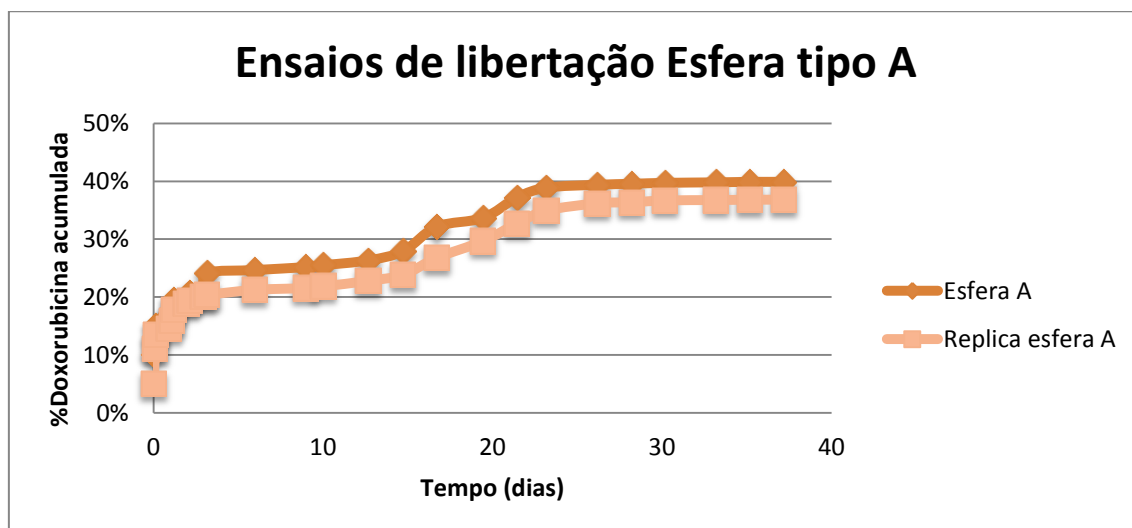


Figura 4.18 Percentagem de Doxorubicina em função do tempo para as esferas do tipo A.

Na figura 4.18 pode observar-se que o perfil de libertação de Doxorubicina apresenta duas fases. A fase correspondente aos primeiros 15 dias, onde a cinética de libertação é de 1ª ordem, é característica de um processo de transporte de fármaco por difusão no interior da esfera. Do dia 15 até ao dia 25, a libertação de fármaco acumulada aumenta linearmente com o tempo, o que pode dever-se à degradação do polímero por hidrólise. A partir do dia 25, não se verifica mais libertação de fármaco.

A subida repentina da percentagem de libertação de fármaco observada nos primeiros 3 dias, pode ter sido originada pela dissolução do fármaco que pode eventualmente ter ficado adsorvido na superfície externa das nanoesferas mesmo depois da lavagem destas.

4.4.2 Ensaios de libertação – Esfera tipo B

Nos ensaios de libertação da Doxorubicina utilizaram-se 8,11mg de nanoesferas tipo B e 7,91mg da sua réplica. A partir das medições da concentração de Doxorubicina efectuadas ao longo de tempo, calculou-se a percentagem de Doxorubicina libertada, utilizando a equação 8 (descrita na secção 3.2.3)

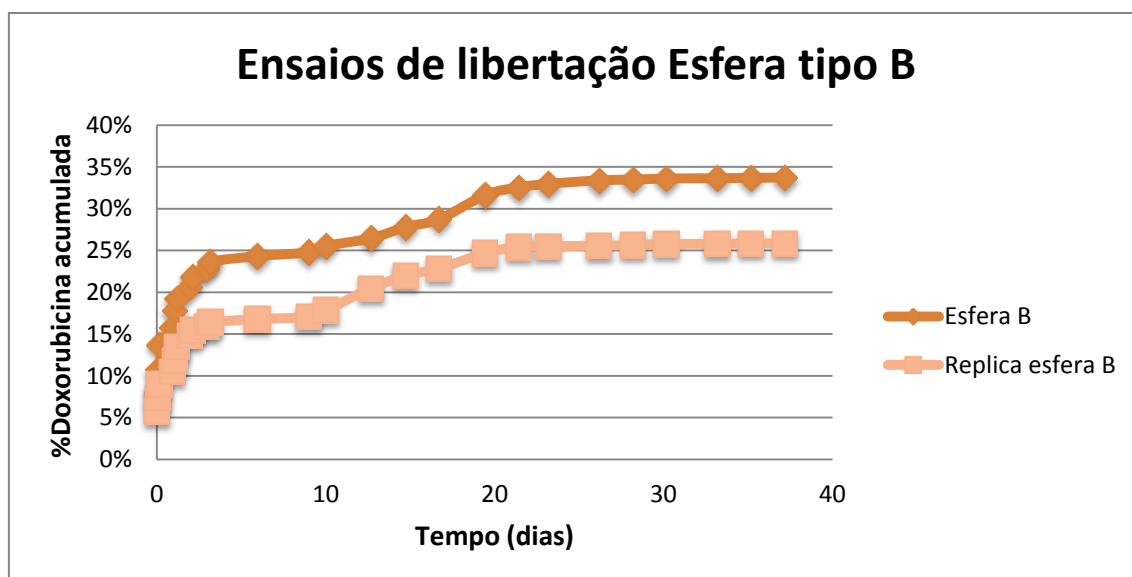


Figura 4.19 Percentagem de Doxorubicina em função do tempo para as esferas do tipo B.

Observando a figura 4.19 verifica-se que o perfil de liberação é semelhante ao apresentado para a figura 4.18.

5 Conclusão

Este trabalho teve como objectivo a preparação e caracterização de nanopartículas de PLGA para libertação controlada de Doxorubicina, usando o programa Statistica para a optimização destas.

O modelo de planeamento de experiências escolhido para este estudo foi o desenho de experiências do composto central. As variáveis dependentes usadas neste trabalho, por se considerar que são as que maior influência têm sobre a estabilidade das nanopartículas e a velocidade de libertação do fármaco, são o tamanho (nm), o potencial zeta (mV), carregamento de fármaco (%p/p) e o rendimento (%p/p). Como variáveis independentes foram escolhidas três variáveis que, em estudos preliminares, mostraram maior influência sobre as características das partículas, sendo estas a concentração de PVA (% P/V) na solução aquosa da primeira emulsão, o volume de solução de PVA (ml) adicionado na formulação da primeira emulsão e o tempo de sonicação (s).

Foram produzidas partículas de PLGA com Doxorubicina, pelo método de evaporação/extracção por solvente, de acordo com o planeamento de experiências construído no Statistica. As nanopartículas foram caracterizadas relativamente ao seu tamanho por DLS, à morfologia por SEM, ao carregamento de fármaco e ao rendimento. As nanopartículas obtidas mostraram ter uma forma esférica com uma superfície lisa.

Procedeu-se à análise dos resultados pelo programa Statistica e foram construídas as curvas de superfície para cada variável dependente. Os resultados mostram que as variáveis independentes com maior efeito nas variáveis dependentes são o volume e a concentração de PVA.

Menores tamanhos e maiores carregamentos de fármaco são obtidos com menores volumes e maiores concentrações de PVA. Quanto ao tempo de sonicação, em geral são obtidos menores tamanhos para tempos menores, no entanto, esta influência é menos evidente do que no caso da concentração e do volume de PVA.

O volume de PVA mostrou igualmente uma grande influência sobre o potencial zeta tendo-se obtido um maior potencial zeta para valores de volume de PVA baixos. Já a % PVA e o tempo de sonicação mostraram afectar pouco o potencial zeta.

Relativamente ao carregamento de fármaco, após a observação dos gráficos de superfície, podemos concluir que ele é independente do tempo de sonicação e apresenta uma grande dependência da % PVA e do volume de PVA. São obtidos maiores valores de carregamento (> 40%) para baixos volumes de PVA e para elevadas % PVA.

Nos gráficos de superfície obtidos pode-se observar que o rendimento diminui com o aumento do tempo de sonicação. Relativamente ao efeito da %PVA e do volume de PVA verifica-se que para %PVA abaixo de 1% o rendimento é independente do volume utilizado e apresenta um valor de rendimento superior a 35%. No entanto, para % PVA superiores, verifica-se que o aumento da %PVA e do volume provocam uma diminuição do rendimento.

Com o objectivo de produzir partículas com tamanhos entre 120-140nm (tipo A) e entre 100-120nm (tipo B), os resultados obtidos pelo Statistica foram analisados tendo-se seleccionado como valores das variáveis independentes para as esferas tipo A 3% (P/V) de PVA, 15 ml de

volume de PVA e 60s de tempo de sonicação, e para as esferas tipo B 3% (P/V) de PVA, 4 ml de volume de PVA e 60s de tempo de sonicação. Efectuou-se uma réplica para cada uma das esferas seleccionadas, para se ter em conta os possíveis erros.

Os resultados obtidos para as esferas tipo A e as esferas tipo B estiveram de acordo com o esperado. As nanopartículas tipo A produzidas nas condições seleccionadas apresentaram um tamanho de 125nm, um potencial zeta de -11.3mV, uma percentagem de carregamento de fármaco entre 10.23 % e 12.58% e um rendimento entre 53.8% e 59.0%, sendo o potencial zeta e o rendimento ligeiramente superiores aos valores esperados. As nanopartículas tipo B produzidas nas condições seleccionadas apresentaram um tamanho de 100nm, um potencial zeta de -9.5mV, uma percentagem de carregamento de fármaco entre 19.44 % e 21.52 % e um rendimento de cerca de 26.2 %, sendo o rendimento ligeiramente inferior ao valor esperado.

Nos estudos dos ensaios de libertação verifica-se que as curvas de percentagem de Doxorubicina libertada em função do tempo são semelhantes para os dois tipos de esferas e apresentam duas fases distintas. A primeira fase corresponde a uma cinética de libertação de 1^a ordem, característica de um processo de transporte de fármaco por difusão no interior da esfera, e a segunda fase corresponde a uma cinética de libertação de ordem zero, onde a libertação de fármaco acumulada aumenta linearmente com o tempo, o que pode ser devido à degradação do polímero por hidrólise.

6 Bibliografia

- [1] Dash, S.; Murthy, P.N.; Nath, L.; Chowdhury, P. Kinetic modeling on drugs release from controlled drugs delivery systems. *Acta Pol. Pharm.*, 2010, 67, 217-223.
- [2] Huang, W.; Shi, X.; Ren, L.; Du, C.; Wang, Y. PHBV microspheres – PLGA matrix composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2010, 31, 4278-4285.
- [3] Klose, D.; Siepmann, F.; Willart, J.F.; Descamps, M.; Siepmann, J. Drugs release from PLGA-based microparticles: Effects of the “microparticle:bulk fluid” ratio. *Int. J. Pharm.*, 2010, 383, 123-131.
- [4] Middleton, J. C.; Tripton, A. J. Synthetic Biodegradable Polymers as Medical Devices. <http://www.mddionline.com/article/synthetic-biodegradable-polymers-medical-devices> (Acedido em janeiro 2012).
- [5] Drug Development e Delivery. <http://www.drug-dev.com/ME2/dirmod.asp?sid=&nm=&type=Publishing&mod=Publications%3A%3AArticle&mid=8F3A7027421841978F18BE895F87F791&tier=4&id=BB85E8579021481EACBC7C3F0674348F> (Acedido em fevereiro 2012)
- [6] Wang, Q.; Wang, J.; Lu, Q.; Detamore, M.S.; Berkland, C. Injectable PLGA based colloidal gels for zero-order dexamethasone release in cranial defects. *Biomaterials*, 2010, 31, 4980-4986.
- [7] Jen, D.M.K.; Cun, D.; Maltesen, M.J.; Frokjaer, S.; Nielsen, H.M.; Foged, C. Spray drying of siRNA- containing PLGA nanoparticles intended for inhalation. *J. Control. Release*, 2010, 142, 138-145.
- [8] Biosciences, <http://www.gbiosciences.com/ResearchProducts/Doxorubicin.aspx> (Acedido em Fevereiro 2012)
- [9] Calado, V.; Montgomery, D.C. Planeamento de experimento usando o Statistica. E-papers: Rio de Janeiro, 2003.
- [10] Duan, Y.; Xu, S.; Wang, Q.; Liu, J.; Zhang, Z. Optimization of preparations of DHAQ-loaded PEG-PLGA-PEG nanoparticles using central composite design. *J. Mater. Sci.*, 2006, 17, 559-563.
- [11] Emani, J.; Hamishehkar, H.; Najafabadi, A.R.; Gilani, K.; Minaiyan, M.; Mahdavi, H.; Mirzadeh, H.; Fakhari, A.; e Nokhodchi, A. Particles size design of PLGA microspheres for potential pulmonary drug delivery using response surface methodology. *J. Microencapsul.*, 2009, 26(1), 1-8.
- [12] Mahmoudi, M.; Simdhi, A.; Imani, M.; Milani, A.S.; Stroeve, P. Optimal Design and Characterization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles coated with Polyvinyl Alcohol for Targeted Delivery and Imaging. *J. Phys. Chem. B* 2008, 112, 14470-14481.
- [13] Packhaeuser, C.B.; Kissel, T. On the design of in situ forming biodegradable parenteral depot systems based on insulin loaded dialkylaminoalkyl-amine-poly(vinyl alcohol)-g-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. *J. Control. Release*, 2007, 123, 131-140.

- [14] Soriano, I.; Evora C.; Llabrés, M. Preparation and evaluation of insulin-loaded poly(DL-lactide) microspheres using na experimental design. *Int. J. Pharm.*, 1996, 142, 135-142.
- [15] Vandervoort, J.; Ludwig, A. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. *Int. J. Pharm.*, 2002, 238, 77-92.
- [16] Dillen, K.; Vandervoort, J.; Mooter, G.; Verheyden, L.; Ludwig, A. Factorial design, physicochemical characterization and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 2004, 275, 171-187.
- [17] Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nystrom, A., Pettersen, J., Bergman, R., Experimental design and optimization. *Chemometr. Intell. Lab.*, 1998, 42, 3-40.
- [18] Bicho, A.; Peça, I.N.; Roque, A.C.A.; Cardoso, M.M. Anti-CD8 conjugated nanoparticles to target mammalian cells expressing CD8. *Int. J. Pharm.*, 2010, 399, 80-86.
- [19] Zidan, A.S.; Sammour, O.A.; Hammad, M.A.; Megrab, N.A.; Habib, M.J.; Khan, M.A. Quality by design: Understanding the formulation variables of a cyclosporine A seif-nanoemulsified drug delivery systems by Box-Behnken design and desirability function. *Int. J. Pharm.*, 2007, 332, 55-63.

7 Anexos

Anexo 1

A concentração de Doxorubicina na amostra foi calculada utilizando uma recta de calibração previamente determinada por espectrofotometria com soluções padrão de Doxorubicina. Os valores de concentração de doxorubicina e da absorvância lida a 482nm encontram-se na tabela abaixo.

Tabela 7.1 Valores da solução padrão.

Amostra	Concentração (mg/L)	Absorvância
<i>P1</i>	26,5	0,542
<i>P2</i>	20,2	0,399
<i>P3</i>	16,7	0,396
<i>P4</i>	13,25	0,286
<i>P5</i>	10,1	0,253
<i>P6</i>	8,35	0,224
<i>P7</i>	6,625	0,146
<i>P8</i>	4,04	0,079
<i>P9</i>	2,65	0,063
<i>P10</i>	1,67	0,047
<i>P11</i>	1,325	0,036
<i>P12</i>	0,404	0,022
<i>P13</i>	0,167	0,01

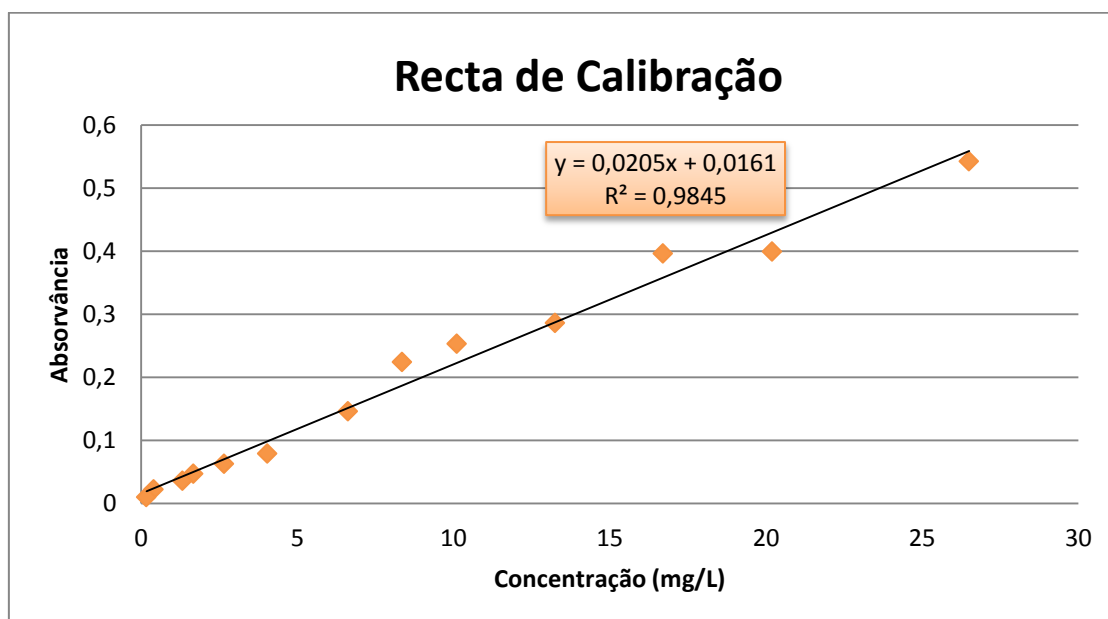


Figura 7.1 Recta de calibração para o cálculo da concentração de Doxorubicina.